

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus Liebig-Universität Giessen
Abteilung für Klinische Immunologie und Bluttransfusion

HL-A-SPEZIFISCHE, KOMPLEMENT-FIXIERENDE PLÄTTCHEN-ALLOANTIKÖRPER UND ANTIGENE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von
Andreas A. Czitrom
Kronstadt

Giessen 1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus Liebig-Universität Giessen
Abteilung für Klinische Immunologie und Bluttransfusion

HL-A-SPEZIFISCHE, KOMPLEMENT-FIXIERENDE PLÄTTCHEN-ALLOANTIKÖRPER UND ANTIGENE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von
Andreas A. Czitrom
Kronstadt

Giessen 1972

Dekan: Prof. Dr. Hj. Staudinger

Referent: Prof. Dr. Ch. Mueller-Eckhardt

Korreferent: Prof. Dr. H.J. Wellensiek



MEINER MUTTER
IN DANKBARKEIT
GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Material und Methoden	3
1. Material	3
1.1. Seren	3
1.2. Eluate	3
1.3. Thrombozyten	3
1.4. Veronal-Puffer	4
1.5. Komplement	4
1.6. Sensibilisierte Hammelblutkörperchen	5
1.7. Testplatten und Mikroliterpipetten	5
2. Methoden	5
2.1. Herstellung der sensibilisierten Hammelblutkörperchen	5
2.2. Komplement-Titration	6
2.3. Gewinnung und Konzentrationseinstellung der Plättchen	7
2.3.1. Gewinnung der Plättchen	7
2.3.2. Fotometrische Einstellung der Plättchensuspension	7
2.4. Mikro-Komplementbindungsreaktion mit Plättchen (MKBR)	8
2.4.1. Versuchsansatz der MKBR mit Plättchen	8
2.4.2. Suchreaktion zum Nachweis C'-fixierender, antithrombozytärer Antikörper bei polytransfunden Patienten mit Hilfe der MKBR	9
2.4.3. HL-A-Typisierung von Plättchen in der MKBR	9
2.4.4. Untersuchung der Plättchen-HL-A-Antigene nach enzymatischer Behandlung	10

	Seite
2.5. Absorption und Elution HL-A-spezifischer Antikörper mit Thrombozyten	11
2.5.1. Absorption	11
2.5.2. Säureelution	11
2.5.3. Wärmeelution	11
2.5.4. Ätherelution	12
3. Statistische Auswertung	12
C. Ergebnisse	13
1. Suchreaktion zum Nachweis C'-fixierender, anti- thrombozytärer Antikörper bei polytransfunden Patienten	13
1.1. Allgemeine Ergebnisse der Suchreaktion	13
1.2. Monospezifische HL-A-Antiseren	22
1.3. Polyspezifische HL-A-Antiseren	22
2. Absorptions- und Elutionsuntersuchungen an HL-A- spezifischen Seren polytransfundierter Patienten	23
3. Methodische Untersuchung der Absorption und Elution HL-A-spezifischer Antikörper mit Plättchen	26
3.1. Einfluß der Plättchenkonzentration	27
3.2. Einfluß der Serummenge	27
3.3. Einfluß der Temperatur	27
3.4. Einfluß der Inkubationszeit	30
3.5. Einfluß des pH bei der Säureelution von HL-A- spezifischen Antikörpern	30
4. Typisierungen von HL-A-Antigenen auf Plättchen in der MKBR	30
5. Einfluß von Enzymen auf HL-A-Antigene von Thrombozyten	46
D. Diskussion	54
E. Zusammenfassung	69
F. Literatur	71

A. EINLEITUNG

Im Bereich der Transplantationsimmunologie haben die Kenntnisse in den letzten Jahren schnell zugenommen. Dazu gehört der rasche Fortschritt in der serologischen Definierung der Antigene des wichtigsten humanen Histokompatibilitätssystems - des HL-A-Systems. Ein genetisches Konzept dieses Systems wurde entwickelt und die erworbenen Kenntnisse in der klinischen Transplantation - vornehmlich der Nierentransplantation - angewandt. Der extreme Polymorphismus des HL-A-Systems und die Heterogenität der Antigene erschwerten jedoch die serologisch exakte Typisierung der Transplantationsantigene und damit die klinische Anwendung. Die genaue Definierung aller HL-A-Antigene, die Aufklärung der exakten chemischen Struktur der Transplantationsantigene und die biologische Bedeutung des HL-A-Systems sind Probleme, die zum größten Teil noch ungelöst sind. Thrombozyten sind Träger wahrscheinlich aller HL-A-Antigene (Übersicht bei 40, 22). Der Nachweis gelingt mit Hilfe der Plättchen-Komplementbindungsreaktion. Die 1970 eingeführte Mikrotechnik der Komplementbindungsreaktion mit Plättchen (MKBR) (6, 8, 18, 37, 9) hat sich neben der Mikro-Lymphozyten-Toxizitätsreaktion (43) als Standardmethode für die Gewebetypisierung durchgesetzt. Die Gewinnung von brauchbaren Antisera ist durch die geringe Empfindlichkeit dieser Methode gegenüber der Mikro-Lymphozyten-Toxizitätsreaktion (MLTox) besonders erschwert.

Die von Shulman et al. (35) inaugurierte Methode der Absorption und Elution HL-A-spezifischer Antikörper mit Thrombozyten ermöglicht die serologische Aufklärung von polyspezifischen Antisera und die Gewinnung von monospezifischen Antikörperspezifitäten in den Eluat (28, 19). Dies schafft die Voraussetzungen für eine breite Anwendung der HL-A-Typisierung von Plättchen in der Transplantationsserologie.

Die noch weitgehend unbekannte chemische Definierung der HL-A-Antigene eröffnet Untersuchungsmöglichkeiten in diesem Bereich. Analog

der von verschiedenen Autoren erzielten Solubilisierung von HL-A-Antigenen von Lymphozyten (23, 15) erscheinen ähnliche Untersuchungen bei Plättchen sinnvoll.

In der vorliegenden Arbeit soll über eigene Untersuchungen zu folgenden Fragen berichtet werden:

1. Möglichkeiten der Gewinnung HL-A-spezifischer Antikörper aus Seren polytransfundierter Patienten für die Plättchen-MKBR.
2. Absorption und Elution polyspezifischer Antiseren zur Abklärung der Antikörperspezifität und Herstellung brauchbarer Testreagenzien für die MKBR mit Plättchen.
3. Methodische Untersuchungen der Absorption und Elution HL-A-spezifischer Antikörper mit Thrombozyten.
4. HL-A-Typisierung der Plättchen eines unausgewählten Blutspenderkollektivs mit Hilfe der MKBR.
5. Untersuchungen über den Einfluß von Neuraminidase und 10 verschiedenen Proteasen auf HL-A-Antigene von Plättchen.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. MATERIAL

1.1. Seren

Ca. 700 Seren von 339 verschiedenen polytransfunden Patienten der Medizinischen Universitätskliniken und Polikliniken Giessen wurden auf das Vorliegen HL-A-spezifischer Antikörper untersucht. Als "polytransfundiert" wurden Patienten definiert, die mindestens 3 Transfusionen an drei verschiedenen Tagen erhalten hatten. Die Patienten erhielten zusätzlich im Untersuchungszeitraum (Mai - November 1971) eine Anzahl von 1 bis 37 Transfusionen. Die Patientenserum wurden nach Zugabe von 1/100 Volumen 1 % Natrium-Azid 30 min. bei 56° C inaktiviert, anschließend 3 bis 5 min. bei 23 000 g zentrifugiert und in Portionen von 1,0 ml bei -20° C eingefroren. Zum Gebrauch in der Mikro-Komplementbindungsreaktion (MKBR) wurden die Seren 1:2 mit Veronal Puffer verdünnt. Bei positivem Ausfall der Suchreaktion wurde nach Möglichkeit vom Patienten eine größere Menge Blut (ca. 100 ml) angefordert, das Serum gewonnen und unverdünnt eingefroren.

1.2. Eluate (E)

Die Eluate wurden in Portionen von je 50 µl bei -20° C eingefroren und unmittelbar vor dem Gebrauch aufgetaut. Die HL-A-Typisierung mit Eluaten erfolgte in der Weise, daß die Eluate in der entsprechenden Verdünnung in Portionen von je 2 µl zusammen mit je 4 µl Veronal Puffer (mit 1/100 Vol. Na-Azid 1 % versetzt) auf Typisierungsplatten aufgetragen und bei -60° C eingefroren wurden.

1.3. Thrombozyten

Für die Suchreaktion auf HL-A-spezifische Antikörper bei polytrans-

fundierten Patienten sowie für Absorptions- und Elutionsuntersuchungen wurden Thrombozyten verwendet, die von entsprechenden Testspendern in 2 - 4 monatigem Abstand gewonnen wurden. Außerdem wurden Plättchen von 423 unverwandten Blutspendern gewonnen, deren HL-A-Antigene in der MKBR typisiert wurden. Die Konservierung der gewaschenen Thrombozytensuspension erfolgte in 0,9 % NaCl mit 0,1 % Na-Azid bei 4° C. Die Plättchenkonzentration betrug jeweils 500 000 Zellen pro cmm. Enzymbehandelte Thrombozyten wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Uhlenbruck aus Köln zur Verfügung gestellt.

1.4. Veronal Puffer (VP)

Es wurde Veronal Puffer (pH 7,3; steril) nach Mayer (25) mit folgender Zusammensetzung verwendet:

NaCl	85	g
5,5-Diäthylbarbitursäure	5,75	g
Natrium-Salz der 5,5-Diäthylbarbitursäure	3,75	g
1 M MgCl ₂	5	ml
1 M CaCl ₂	1,5	ml
entionisiertes Wasser	ad 2000	ml

Zum Gebrauch in der MKBR wurde der Puffer 1:5 mit Aqua dest. verdünnt und bei 4° C aufbewahrt. Nach der Verdünnung betrug die Endkonzentration der Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺ Ionen 0,00015 M bzw. 0,0005 M.

1.5. Komplement (C')

Als Komplementquelle diente humanes AB-Serum mit ausreichendem Komplementtiter, das in kleinen Portionen zu je 1,0 ml bei -20° C gelagert wurde. Das AB-Serum wurde unmittelbar vor dem Gebrauch einmalig aufgetaut.

1.6. Sensibilisierte Hammelblutkörperchen (SHBK)

Hammelblutkonserven à 10 ml wurden in zweiwöchigen Abständen von der Biologischen Arbeitsgemeinschaft Lich geliefert und bei 4⁰ C aufbewahrt.

Ambozeptor (Anti-Sheep-Hämolysin 1:4000) für die Komplementbindungsreaktion der Firma Behring, Marburg, wurde in einer Verdünnung von 1:50 mit NaCl in Portionen von je 0,5 ml bei -20⁰ C eingefroren.

1.7. Testplatten und Mikroliterpipetten

Die Reaktion wurde auf Mikrotestplatten (Microtest Tissue Culture Plates-Falcon Plastics No. 3034) oder den entsprechenden Mikrotestplatten der Firma Greiner & Söhne, Nürtingen, durchgeführt. Vor Pipettieren der Reaktionsansätze wurden die Platten mit jeweils 6 ml Öl (Shell Ondina 33) gefüllt. Mit Hilfe von 100 µl-Mikropipetten der Hamilton Company, Whittier, California, USA, erfolgte das Auftragen der Ansätze auf die Testplatten.

2. METHODEN

2.1. Herstellung der Sensibilisierten Hammelblutkörperchen (SHBK)

I. Herstellung einer 6 %igen HBK-Suspension

Ca. 5 ml Hammelblutkörperchen wurden dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen (3 x 5 min. bei ca. 1200 g zentrifugiert). Anschließend wurden 0,6 ml des Erythrozytensedimentes in 9,4 ml 0,9 %iger NaCl suspendiert. 0,1 ml dieser Hammelblutkörperchensuspension (A) wurden in 2,9 ml Aqua dest. hämolysiert und die Extinktion bei 546 nm im Eppendorf Fotometer bestimmt. Aus der ermittelten Extinktion wurde die 6 %ige Erythrozytensuspension wie

folgt berechnet und eingestellt:

$$\frac{E}{0,300} = \frac{\text{gefundene Extinktion}}{\text{"Soll" Extinktion}} = f$$

$$9,9 \text{ (ml HBK Suspension)} \times f = \text{Vol. x}$$

9,9 ml der Hammelblutkörperchensuspension (A)

wurden ad. Vol. x mit 0,9 %iger NaCl Lösung aufgefüllt
(6 %ige HBK-Suspension).

II. Vorbereitung des Ambozeptors

0,5 ml Ambozeptor (1:50 in NaCl verdünnt und bei -20°C gelagert) wurde aufgetaut und mit 9,5 ml physiologischer NaCl auf 1:1000 verdünnt. Die Hämolyisinverdünnung betrug somit $4 \times \text{HD } 100$ (das vierfache der minimalen Hämolyisin-Dosis).

III. Sensibilisierung der HBK

10 ml der 6 %igen HBK-Suspension wurden mit 10 ml Ambozeptorverdünnung (1:1000) gemischt und 30 min. in 37°C Wasserbad inkubiert. Die erhaltene 3 %ige Suspension wurde nach der Herstellung bei 4°C bis maximal 48 Std. aufbewahrt. Vor Gebrauch in der MKBR mit Plättchen wurde diese Suspension 1:2 mit Veronal Puffer verdünnt. Die HBK-Konzentration betrug jetzt im Durchschnitt 280 000 Zellen / cmm.

2.2. Komplement (C') Titration

Die C'-Titration erfolgte analog zum Hauptansatz, wobei das dreifache Volumen Komplementverdünnung und statt der Plättchensuspension und des Antiserums 0,9 % NaCl mit 0,1 % Na-Azid und inaktiviertes AB-Serum verwendet wurde (siehe Tab. 1).

Die Komplementverdünnung, die eine 95 %ige Hämolyse der SHBK ergab (H95), diente als Ausgangstitel zur Berechnung der im Hauptansatz zu benutzenden Komplementmenge ($4,5 \times \text{H95}$).

Tab. 1: C'-Titrations-Ansatz

Komplementverdünnung (1:20, 1:30 usw. bis 1:120)	6 μ l
Natrium-Azid 0,1 %	2 μ l
AB-Serum inaktiv (1:2)	2 μ l

Mischen und 2 Stdn. bei 37⁰ C inkubieren

SHBK	2 μ l
------	-----------

Mischen und 30 min. bei 37⁰ C inkubieren

Zentrifugieren und Ablesen

2.3. Gewinnung und Konzentrationseinstellung der Plättchen

2.3.1. Gewinnung der Plättchen

0,5 %iges EDTA Blut wurde 20 min. bei 850 UpM (110 x g) zentrifugiert. Der Überstand - Plättchenreiches Plasma (PRP) - wurde abpipettiert und 15 min. bei 3000 UpM (1300 x g) zentrifugiert. Das Thrombozytensediment wurde anschließend dreimal in physiologischer NaCl gewaschen (3 x 10 min. bei 3000 UpM zentrifugiert). Nach dem letzten Waschen wurde der Plättchenbodensatz in 0,1 %igem Natrium-Azid resuspendiert und bei 4⁰ C aufbewahrt.

2.3.2. Fotometrische Einstellung der Plättchensuspension

Die Einstellung der Plättchensuspension erfolgte mittels fotometrischer Messung bei 405 nm (Eppendorf Fotometer; d=1cm). Vorausgegangene Untersuchungen der Beziehung von Plättchenkonzentration und Plättchenextinktion hatten ergeben, daß der Extinktion 1,350, 500 000 Plättchen/cmm entsprechen. Durch Verdünnung mit 0,9 %igem NaCl (mit 0,1 % Na-Azid) wurden alle Plättchensuspensionen auf diese Extinktion von 1,350 eingestellt und bei 4⁰ C aufbewahrt.

2.4. Mikro-Komplementbindungsreaktion (MKBR) mit Plättchen

Die MKBR mit Plättchen wurde nach der von D. Heinrich und Ch. Mueller-Eckhardt (20) angegebenen Methode durchgeführt.

2.4.1. Versuchsansatz der MKBR mit Plättchen

Versuchsansatz und Ablauf sind aus Tab. 2 zu entnehmen.

Tab. 2: Versuchsansatz der MKBR mit Plättchen

Veronal Puffer	4 μ l
Plättchensuspension (500 000/cmm)	2 μ l
Serum bzw. Eluat	2 μ l
Komplementverdünnung	2 μ l

Mischen^x und 2 Stdn. bei 37⁰ C inkubieren

Sensibilisierte Hammelblutkörperchen (300 000/cmm)	2 μ l
---	-----------

Mischen^x und 30 min. bei 37⁰ C inkubieren

Zentrifugieren^{xx} und Ablesen^{xxx}

^x Das Mischen des Reaktionsansatzes erfolgte durch Vibrationen der Testplatte mittels Auflegen auf eine Eppendorf Schüttelmaschine (15 sec).

^{xx} Das Zentrifugieren der Testplatten erfolgte in eigens angefertigten Zentrifugeneinsätzen 3 min. bei 600 g.

^{xxx} Der Grad der Hämolyse der Reaktionsansätze wurde makroskopisch von "1" (100 %ige Hämolyse) bis "5" (vollkommene Hemmung der Hämolyse) beurteilt. Hierbei wurden sowohl die Größe des Hamelerythrozyten-Bodensatzes als auch die Farbe des Überstandes berücksichtigt.

2.4.2. Suchreaktion zum Nachweis komplementfixierender, antithrombozytärer Antikörper bei polytransfunden Patienten mit Hilfe der MKBR

Als Testzellen für die Suchreaktion in der MKBR wurden Thrombozyten von 19 ausgesuchten Blutspendern der Blutgruppe 0 (13 Zellen), A (4 Zellen) und B (2 Zellen) verwendet. Die Testzellen waren mit Hilfe der Mikro-Lymphozyten-Toxizitätsreaktion (MLTox) nach Terasaki & McClelland (43) typisiert. Folgende HL-A-Antigene waren auf den Plättchen vertreten: 1, 2, 3, 9, 10, 11 und W28 auf dem ersten (LA) Locus und 5, 7, 8, 12, 13, W5, W10, W14, W15, W22, W27, SL auf dem zweiten (vier) Locus. Plättchen von nicht vollständig typisierten Spendern wurden ebenfalls aufgenommen, um dadurch noch nicht definierte Antigene zu erfassen.

Bei positivem Ausfall der Suchreaktion erfolgte nach Möglichkeit eine weitere Abklärung der Antikörperspezifität durch Absorptions- und Elutionsuntersuchungen. Die gewonnenen Eluate wurden ebenfalls gegen dieselben Plättchen getestet. Einige dieser Eluate wurden als Testreagenzien für die Typisierung von Plättchen in der MKBR verwandt, so daß die Antikörperspezifität durch Austestung an einer größeren Anzahl von Plättchen gesichert werden konnte.

2.4.3. HL-A-Typisierung von Plättchen in der MKBR

Als Testreagenzien für die Typisierungen in der MKBR dienten 163 Eluate, die aus 55 verschiedenen HL-A-spezifischen Seren (36 Schwangerenserum und 19 Seren polytransfundierter Patienten) durch Absorption und Elution hergestellt worden waren. Die Eluate wurden unverdünnt oder, entsprechend ihrer Titerstärke, in verschiedenen Verdünnungsstufen angesetzt. Unter den Testreagenzien waren neben monospezifischen auch bi- und polyspezifische Eluate vertreten. Mit Hilfe dieser Eluate konnten 7 HL-A-Antigene des 1 Locus (1, 2, 3, 9, 11, W28 und Gi2) und 13 Antigene des 2 Locus (5, 7, 8, 12, 13, W5, W10, W14, W15, W22, W27, SL und Gi1) auf Throm-

bozyten typisiert werden. Bis auf W22, HL-A8 und HL-A12 wurden alle Antigene durch mindestens 2 verschiedene Eluate bestimmt. Insgesamt wurden 423 unverwandte Blutspender der Gießener Blutbank mit Hilfe der Plättchen-MKBR typisiert. Ca. 60 Typisierungen wurden doppelt durchgeführt. Die Typisierungsergebnisse wurden mit parallelen Typisierungen der gleichen Blutspender in der MLTox verglichen.

2.4.4. Untersuchung der Plättchen-HL-A-Antigene nach enzymatischer Behandlung

Die enzymatische Behandlung der Thrombozyten wurde von Herrn Prof. Uhlenbruck in Köln durchgeführt. Die Behandlung erfolgte während 15 min. bei 37° C. Es wurden nur Plättchen verwendet, deren HL-A-Antigene vollständig bestimmt waren. Die verwendeten Thrombozyten und die zur Behandlung benutzten Enzyme sind in Tab. 3 zusammengestellt.

Tab. 3: Enzymatisch behandelte Plättchen

<u>Plättchen</u>	<u>HL-A-Typ</u>	<u>Enzyme</u>	
Drebert (I)	1, 9/SL, Gi1	Neuraminidase	
		Subtilisin	0, 1 %
Reinhard	2, 3/W27, W15	Neuraminidase	
		Pronase	0, 01 %
Nagel	3, 9/W5, W15	Neuraminidase	
		Pronase	0, 01 %
Queckbörner	1, 2/5, 8	Neuraminidase	
		Subtilisin	0, 1 %
Seibert	2, 3/7, Gi1	Bromelin	0, 1 %
		Thermolysin	0, 1 %
		Papain	0, 1 %
		Brinase	0, 1 %
Drebert (II)	1, 9/SL, Gi1	Chymotrypsin	0, 1 %
		Trypsin	0, 1 %
		Ficin	0, 1 %
		Pilz Proteinase	0, 1 %

2.5. Absorption und Elution HL-A-spezifischer Antikörper mit Thrombozyten

Die Methode wurde in einer Modifikation des von Shulman et al. (35) beschriebenen Säureelutionsverfahrens durchgeführt.

2.5.1. Absorption

Zur Absorption eines Antiserums wurden in der Regel 3×10^9 Plättchen verwendet. Je nach Titerstärke des Antiserums wurden die Plättchen mit 0,5 - 2,0 ml Serum 3×60 min. unter fortwährendem Schütteln bei 37°C Wasserbad inkubiert und anschließend 15 min. bei 2000 g zentrifugiert. Der erste Überstand (Absorbat) wurde bei -20°C eingefroren, die restlichen verworfen.

2.5.2. Säureelution

Nach dem letzten Absorptionsschritt wurde das mit Antikörper beladene Plättchensediment in ca. 10 ml gepufferter physiologischer NaCl Lösung (pH 7,2) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Plättchensediment wurde dann in 0,3 ml ungepufferter physiologischer NaCl Lösung resuspendiert und durch Zugabe von 0,1 N HCl auf pH 2,8 - 3,0 eingestellt. Nach einer 10 min. Inkubation und anschließender Zentrifugation (15 min. bei 2000 x g) wurde der Überstand (Eluat) gewonnen, durch Zusatz von 0,1 N NaOH und 0,01 N NaOH neutralisiert (pH 7,0 - 7,2) und ad 0,5 ml mit gepufferter physiologischer NaCl Lösung aufgefüllt. Nach 5 min. Zentrifugation bei 23 000 g wurden die Eluate in 50 μl Portionen bei -20°C eingefroren.

2.5.3. Wärmeelution

Nach dem Waschvorgang wurde das mit Antikörper beladene Plättchensediment in ca. 5 ml gepufferter physiologischer NaCl Lösung resuspendiert, 15 min. bei 56°C Wasserbad inkubiert und anschließend im heißen Wassermantel bei 2000 g 10 min. zentrifugiert. Der sofort gewonnene Überstand (Eluat) wurde bei -20°C eingefroren.

2.5.4. Ätherelution

Die Ätherelution erfolgte nach dem von Rubin (30) bei den Erythrozyten beschriebenen Verfahren. Zu den gewaschenen Zellen wurde 1 ml gepufferte NaCl Lösung und 2 ml Äthyläther dazugegeben, durch 1 min. Schütteln gemischt und 10 min. bei 2000 g zentrifugiert. Der Äther und der darunter liegende Zelldetritus wurden abgesaugt und die restliche Lösung (Eluat) 1 Std. bei 37° C und 1 Std. bei 4° C inkubiert. Das erhaltene Eluat wurde ebenfalls bei -20° C eingefroren.

3. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Zur Auswertung der Antikörperspezifität von HL-A-spezifischen Seren und Eluaten diente der Vierfelder-Test unter Berechnung von X^2 , dem Korrelationskoeffizient r und der Irrtumswahrscheinlichkeit p . Verglichen wurden jeweils die Reaktion eines unbekannten Serums bzw. Eluates mit dem bekannten HL-A-Antigen der Testplättchen. Die wahrscheinlichste Antikörperspezifität wurde dann statistisch berechnet (49,50). Die Reaktionen des unbekannten Serums bzw. Eluates wurden, bezogen auf die jeweilige Antigenspezifität, nach gemeinsam positiven (a), gemeinsam negativen (d), falsch positiven (b) und falsch negativen (c) Ergebnissen aufgeschlüsselt und X^2 bzw. r wie folgt berechnet:

$$X^2 = \frac{(ad - bc)^2 \times N}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)} \quad \text{und} \quad p < 0,05 \text{ bei } X^2 > 3,8$$

$$r = \frac{ad - bc}{\sqrt{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}} = \pm \sqrt{\frac{X^2}{N}}$$

Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde aus X^2 mit Hilfe von Geigy-Tabellen ermittelt.

C. ERGEBNISSE

1. SUCHREAKTION ZUM NACHWEIS C'-FIXIERENDER ANTI-THROMBOZYTÄRER ANTIKÖRPER BEI POLYTRANSFUNDIERTEN PATIENTEN

1.1. Allgemeine Ergebnisse der Suchreaktion

Bei der Untersuchung von ca. 700 Seren von 339 verschiedenen polytransfunden Patienten wurden bei 17 Patienten (5,01 %) HL-A-spezifische Antikörper gefunden (Abb. 1). Die prozentuale Verteilung der 339 Patienten nach der Anzahl der erhaltenen Transfusionen im Untersuchungszeitraum Mai - November 1971 ist aus Abb. 2 zu ersehen. Die Häufigkeit, der in Abhängigkeit von der Anzahl der Transfusionen bei den Patienten gefundenen HL-A-positiven Seren, geht aus Abb. 3 hervor. Der Prozentsatz der gefundenen HL-A-positiven Seren lag mit 2,5 % am niedrigsten in der Gruppe der Patienten, die weniger als 3 Transfusionen erhalten hatten (59 % der Gesamtpatientenzahl) und mit 50 % am höchsten in den Gruppen mit 22 - 24 und 25 - 27 Transfusionen, die jeweils nur 0,6 % der Gesamtpatienten repräsentierten.

Von den 339 Patienten hatten 141 (41,6 %) die Blutgruppe 0, 149 (44 %) die Blutgruppe A, 32 (9,4 %) die Blutgruppe B und 17 (5,2 %) Patienten die Blutgruppe AB. Bei den Patienten der Blutgruppe 0 und B fanden sich zusätzlich Immunantikörper (Hämolsine) gegen die Antigene A und AB (Abb. 4). Die prozentuale Verteilung dieser Patienten nach Anzahl der erhaltenen Transfusionen ist in Abb. 5 (a,b) dargestellt. Die Verteilung von Seren mit Anti-A- und Anti-AB-Hämolsinen innerhalb dieser Gruppen polytransfundierter Patienten ist aus Abb. 6 zu entnehmen.

Abb. 1. HL-A-spezifische Antikörper in den Seren von 339 polytransfunden Patienten

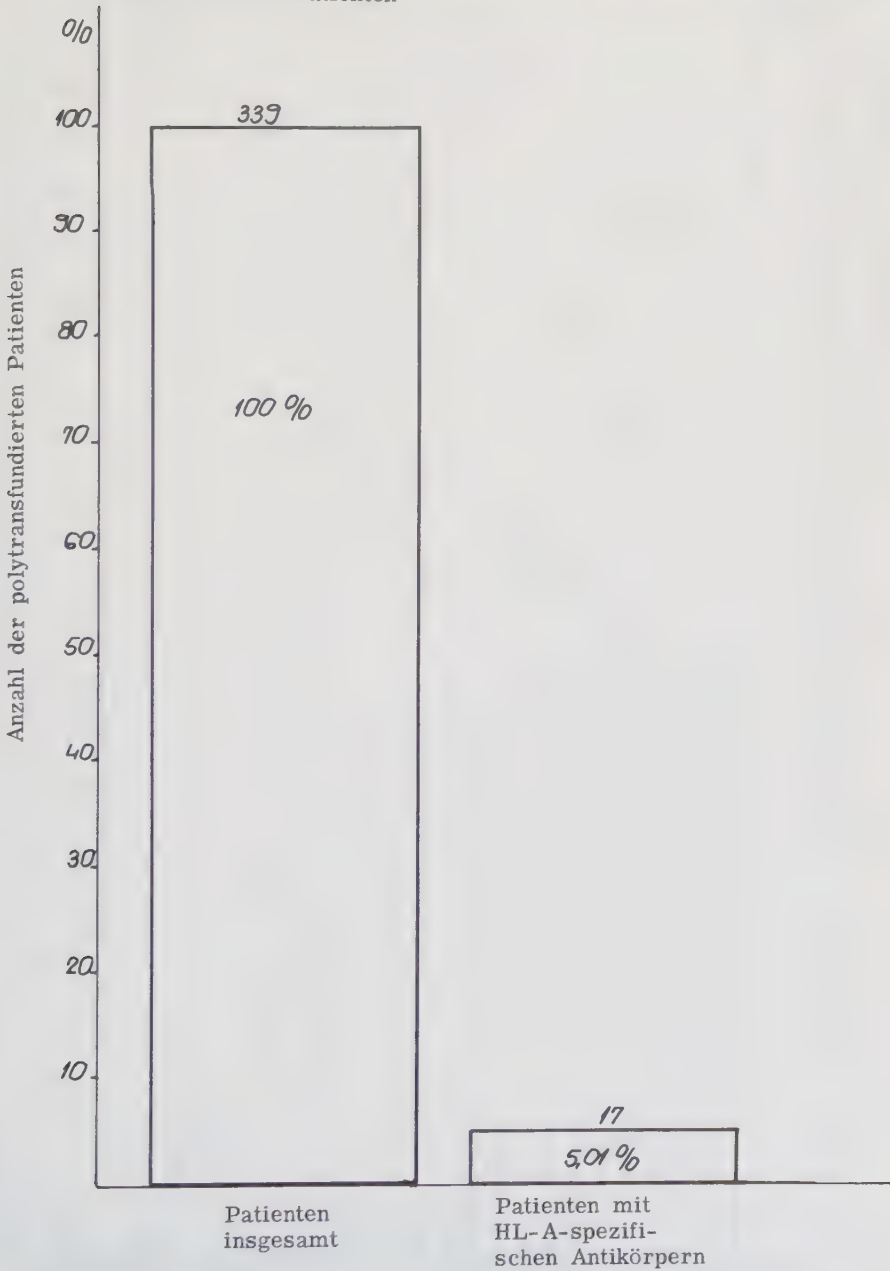


Abb. 2. Prozentuale Verteilung der 339 polytransfunden Patienten nach Anzahl der erhaltenen Transfusionen

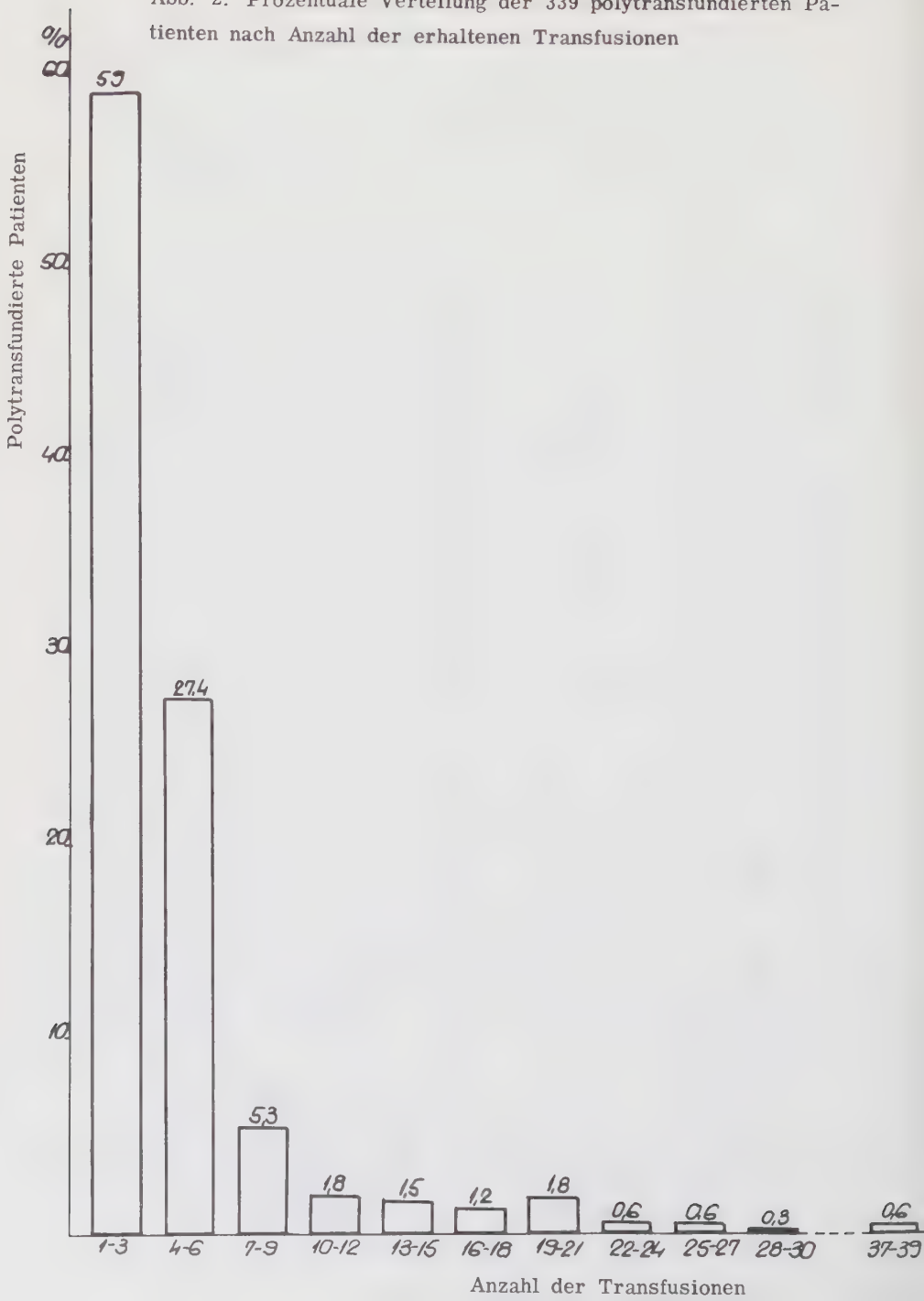


Abb. 3. Häufigkeit der HL-A-spezifischen Seren bei 339 polytransfunden Patienten nach Anzahl der erhaltenen Transfusionen

Patienten mit HL-A-spezifischen Antikörpern

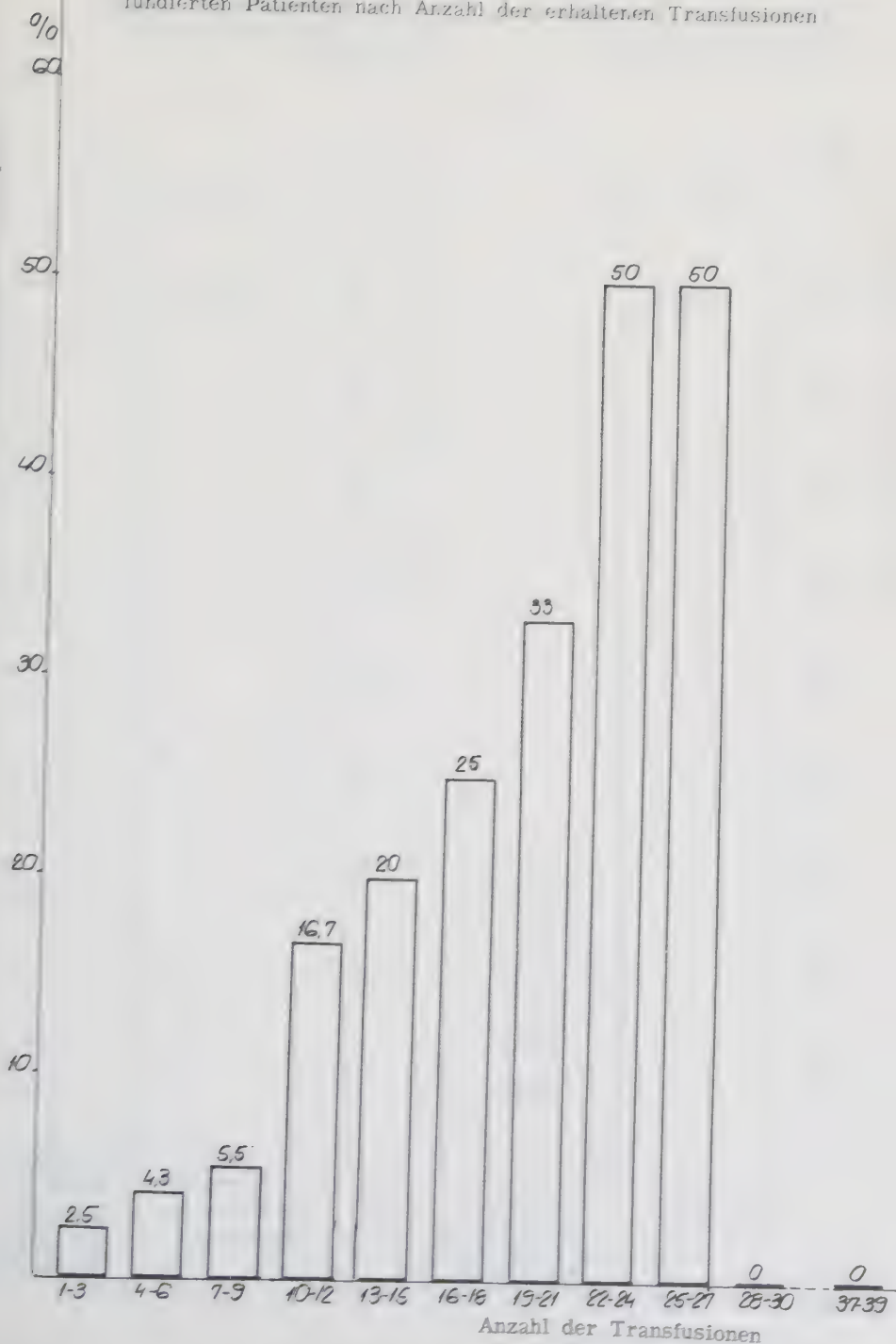


Abb. 4.

Anti-A- und Anti-AB-Hämolysine bei 141 polytransfunden Patienten der Blutgruppe 0

Anti-A-Hämolysine bei 32 polytransfunden Patienten der Blutgruppe B

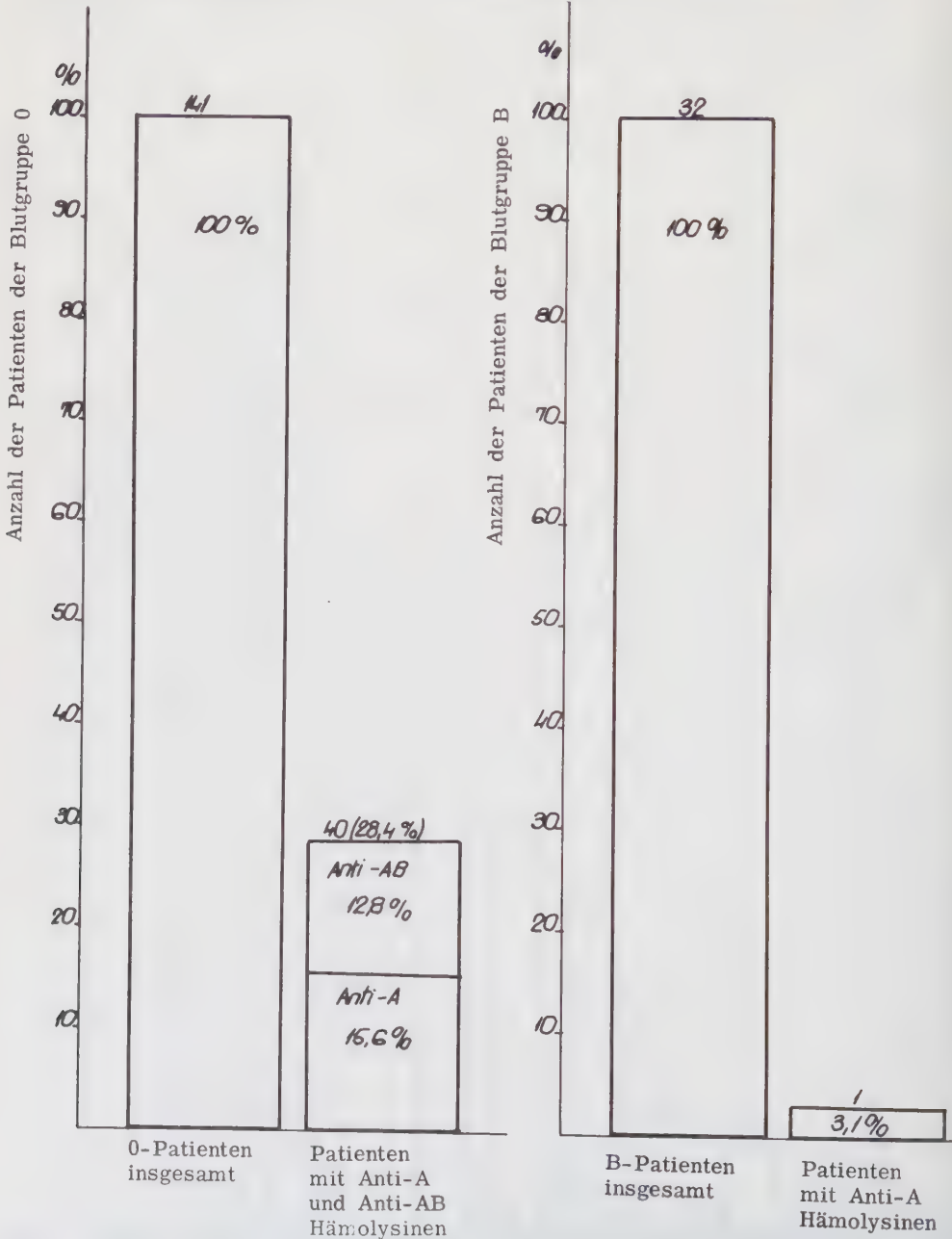


Abb. 5a. Prozentuale Verteilung der 141 polytransfunden Patienten der Blutgruppe 0 nach Anzahl der erhaltenen Transfusionen

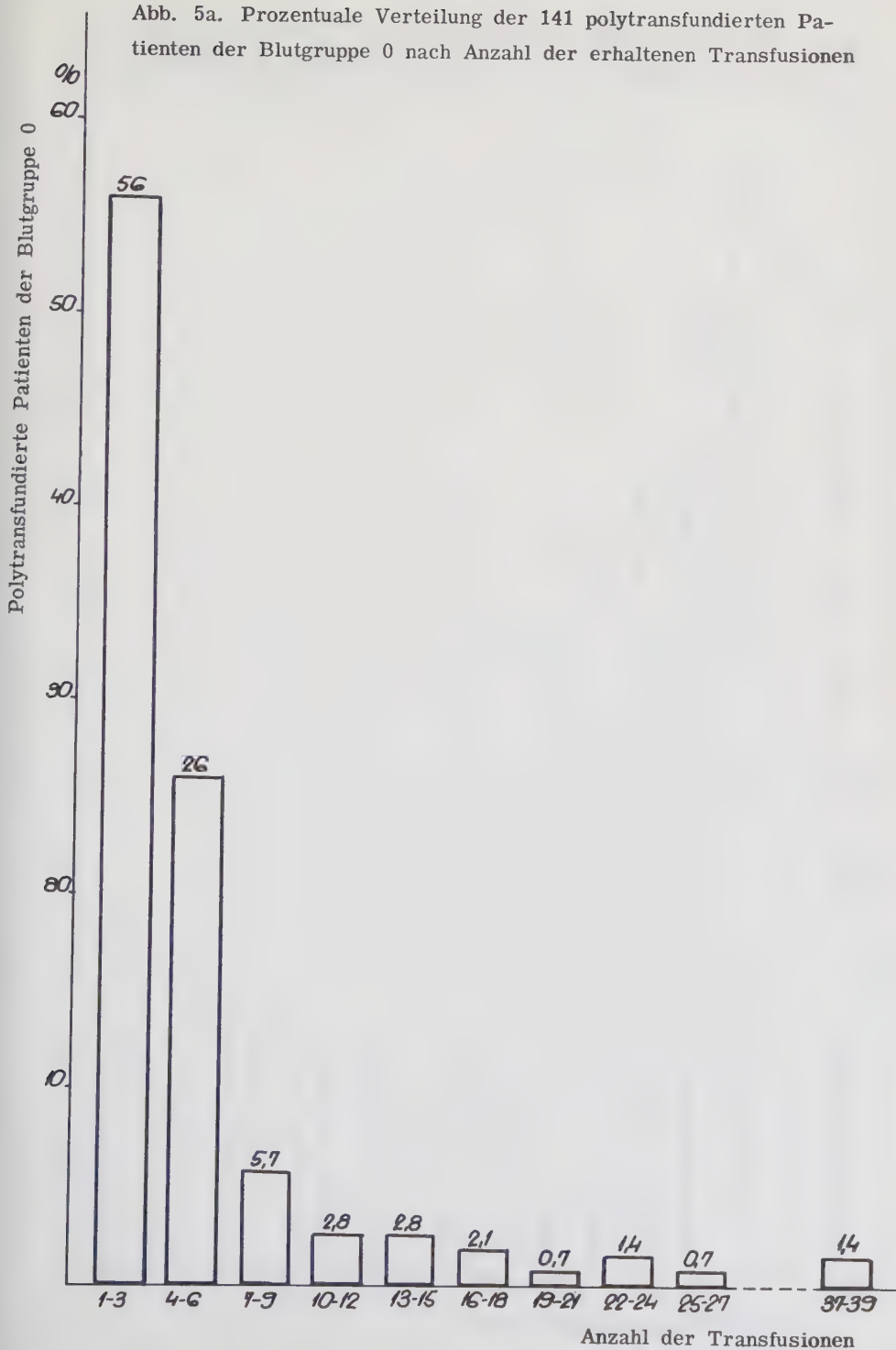


Abb. 5b. Prozentuale Verteilung der 32 polytransfunden Patienten der Blutgruppe B nach Anzahl der erhaltenen Transfusionen

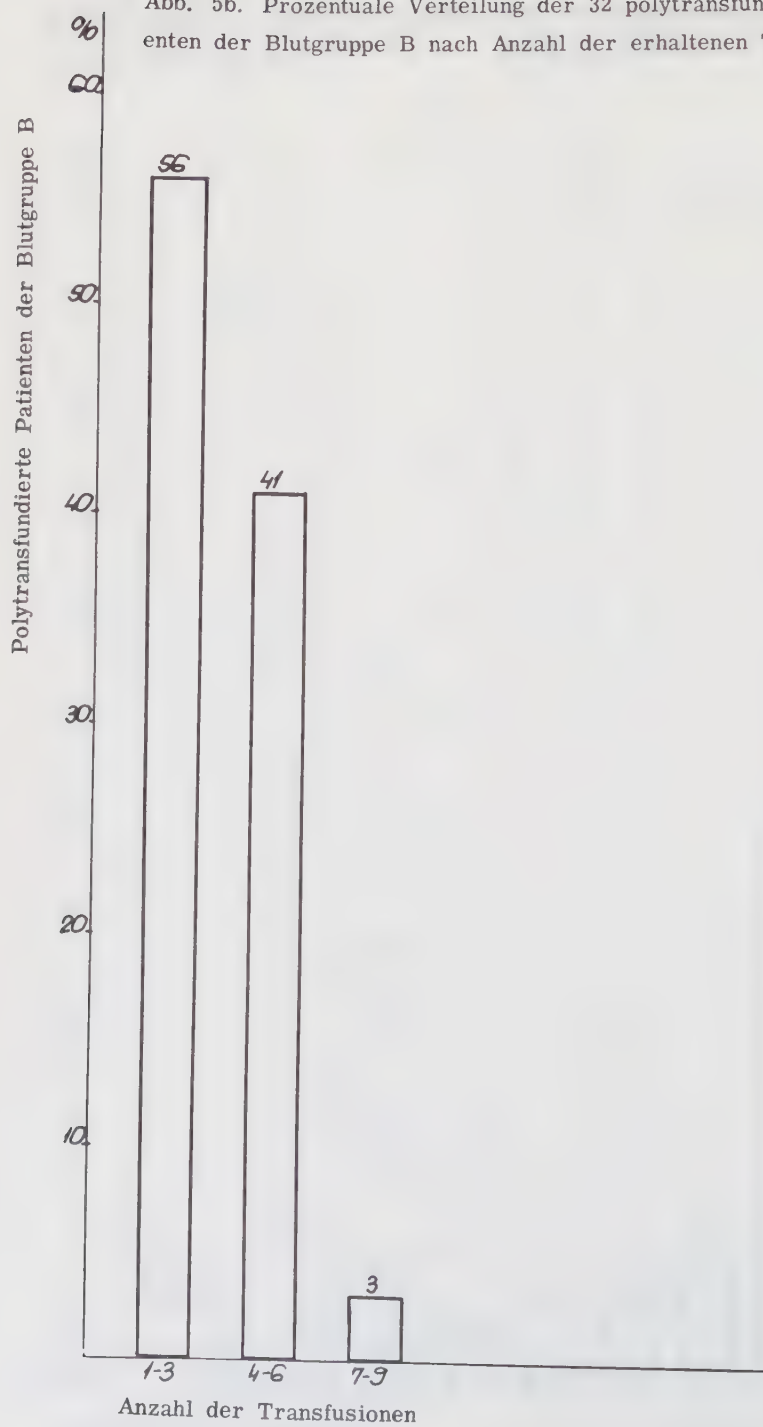
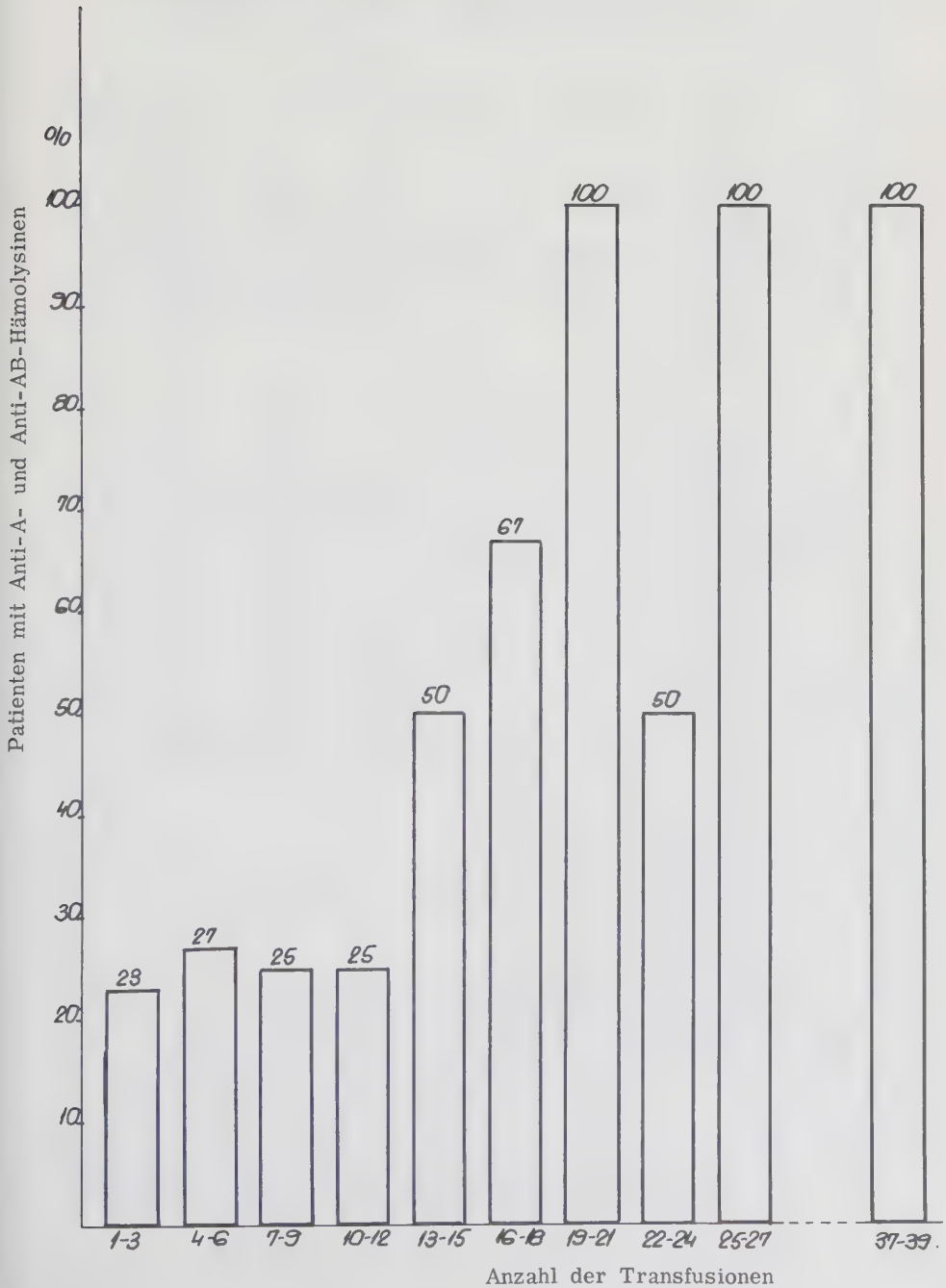


Abb. 6. Häufigkeit der Seren mit Anti-A- und Anti-AB-Hämolysinen bei 141 polytransfunden Patienten der Blutgruppe 0 nach Anzahl der erhaltenen Transfusionen



Tab. 4. Auswertung der in der Suchreaktion in der Plättchen-MKBR
gefundenen HL-A-spezifischen Antiseren

<u>Serum</u>	<u>Antikörperspezifität</u>	<u>N</u>	<u>X²</u>	<u>r</u>	<u>p</u>
S. A.	Anti-HL-A 5	19	19,00	1,00	< 0,001
F. L. (P-46)	Anti-HL-A 13	19	19,00	1,00	< 0,001
P. E. (P-51)	Anti-HL-A 2	19	19,00	1,00	< 0,001
B. P. (P-53)	Anti-Gi-2	19	19,00	1,00	< 0,001
F. E. (P-41)	Anti-HL-A 7 + W27	19	19,00	1,00	< 0,001
	Anti-HL-A 7	16	16,00	1,00	< 0,001
	Anti-W27	16	16,00	1,00	< 0,001
L. E. (P-50)	Anti-HL-A 3 + (1)	19	15,39	0,90	< 0,001
	Anti-HL-A 3	15	15,00	1,00	< 0,001
	Anti-HL-A (1)	11	4,95	0,67	< 0,05
P. A. (P-42)	Anti-HL-A 7 + W10 + 8	19	19,00	1,00	< 0,001
	Anti-HL-A 7	12	12,00	1,00	< 0,001
	Anti-W10	13	13,00	1,00	< 0,001
	Anti-HL-A 8	12	12,00	1,00	< 0,001
V. M. (P-43)	Anti-W10	19	10,97	0,76	< 0,001
P. H. (P-54)	Anti-HL-A 5 + 12 + SL	19	15,03	0,88	< 0,001
S. K.	Spezifität nicht identifiziert				
I. H.	Spezifität nicht identifiziert				
N. E.	Spezifität nicht identifiziert				
M. K.	Spezifität nicht identifiziert				
A. O.	Spezifität nicht identifiziert				
K. K.	Spezifität nicht identifiziert				
G. H.	Spezifität nicht identifiziert				
K. I.	Spezifität nicht identifiziert				

1.2. Monospezifische HL-A-Antiseren

Unter den Seren polytransfundierter Patienten konnten insgesamt 4 monospezifische Antiseren identifiziert werden: 1 x Anti-HL-A 5, 1 x Anti-HL-A 13, 1 x Anti-HL-A 2 und einmal ein Antiserum, welches zunächst als Anti-Gi 2 benannt und sich später, nach vergleichenden Untersuchungen mit Dr. Colombani (Paris), als Anti-Ao 28 identifiziert wurde. Alle 4 Antiseren zeigten eine Übereinstimmung der Reaktionsergebnisse mit den entsprechenden Typisierungen der Zellen von $p < 0,001$.

1.3. Polyspezifische Antiseren

Nach den Ergebnissen der Suchreaktion waren 13 Seren polyspezifisch. 5 dieser polyspezifischen Seren konnten, nach den Ergebnissen der Suchreaktion, in ihrer Antikörperspezifität fast vollständig identifiziert werden (Anti-HL-A 7 + W27, Anti-HL-A 3 + (1), Anti-HL-A 7 + W10 + 8, Anti-HL-A 5 + 12 + SL, Anti-W10 + ?).

Bei 8 in der MKBR positiven Seren konnte nach den Ergebnissen der Suchreaktion keine Antikörperspezifität festgestellt werden.

Die in der Suchreaktion identifizierten mono- und polyspezifischen Seren sind in Tab. 4 zusammengestellt.

2. ABSORPTIONS- UND ELUTIONSUNTERSUCHUNGEN AN HL-A-SPEZIFISCHEN SEREN POLYTRANSFUNDIERTER PATIENTEN

Absorptions- und Elutionsuntersuchungen wurden mit den 5 in der Suchreaktion polyspezifischen und einem der monospezifischen Antiseren durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 (a, b, c) zusammengefaßt.

Das Serum P53 erwies sich auch nach Absorption und Elution in der MKBR als monospezifisch. Vergleichende Untersuchungen von

Tab. 5a. Ergebnisse der Absorptions- und Elutionsuntersuchungen
mit den Seren P-53 und P-41

<u>Eluat</u>	<u>Antikörperspezifität</u>	<u>N</u>	<u>x²</u>	<u>r</u>	<u>p</u>
P-53					
E(3, 9/W5, W15)	Gi-2	19	19, 00	1, 00	< 0, 001
E(Gi2, -/W27, SL)	Gi-2	19	19, 00	1, 00	< 0, 001
E(Gi2, -/W27, SL)	Gi-2	149	149, 00	1, 00	< 0, 001
E(Gi2, -/W27, SL)	Gi-2	146	146, 00	1, 00 ,	< 0, 001
E(2, 10/7, 12)	----	Keine C' -Fixation			
P-41					
E(1, 9/7, SL)	HL-A 7 + W27	19	19, 00	1, 00	< 0, 001
	HL-A 7	16	16, 00	1, 00	< 0, 001
	W27	16	16, 00	1, 00	< 0, 001
E(W28, -/W27, W14)	HL-A 7 + W27	146	141, 35	0, 98	< 0, 001
	HL-A 7	138	132, 95	0, 98	< 0, 001
	W27	107	107, 00	1, 00	< 0, 001
E(W28, -/W27, W14)	HL-A 7 + W27	94	94, 00	1, 00	< 0, 001
	HL-A 7	84	84, 00	1, 00	< 0, 001
	W27	69	69, 00	1, 00	< 0, 001
E(Gi2, -/W27, SL)	HL-A 7 + W27	192	179, 19	0, 96	< 0, 001
	HL-A 7	179	179, 00	1, 00	< 0, 001
	W27	137	102, 89	0, 86	< 0, 001
E(2, 3/7, -)	HL-A 7	94	94, 00	1, 00	< 0, 001
E(W28, -/W5, 12)	HL-A 7	95	90, 35	0, 97	< 0, 001
E(1, 9/7, SL)	HL-A 7	98	98, 00	1, 00	< 0, 001

Tab. 5b. Ergebnisse der Absorptions- und Elutionsuntersuchungen
mit den Seren P-50 und P-42

<u>Eluat</u>	<u>Antikörperspezifität</u>	<u>N</u>	<u>χ^2</u>	<u>r</u>	<u>p</u>
P-50					
E(2, 3/W27, W15)	HL-A 3 + (1)	19	15,39	0,89	<0,001
	HL-A 3	15	15,00	1,00	<0,001
	HL-A (1)	11	6,51	0,76	<0,025
E(2, 3/7, -)	HL-A 3 + (1)	19	15,35	0,89	<0,001
	HL-A 3	15	15,00	1,00	<0,001
	HL-A (1)	11	6,51	0,76	<0,025
P-42					
E(2, 10/7, 12)	HL-A 7 + W10	19	19,00	1,00	<0,001
	HL-A 7	15	15,00	1,00	<0,001
	W10	16	16,00	1,00	<0,001
E(2, 9/12, W10)	HL-A 7 + W10	19	19,00	1,00	<0,001
	HL-A 7	15	15,00	1,00	<0,001
	W10	16	16,00	1,00	<0,001
E(1, 3/8, -)	HL-A 8	19	6,10	0,56	<0,025!
E(1, 3/8, -)	HL-A 8	94	45,95	0,69	<0,001
E(1, 2/8, W15)	HL-A 8	19	6,10	0,56	<0,025!
E(1, 2/8, W15)	HL-A 8	94	45,95	0,69	<0,001
E(1, 11/W5, 8)	HL-A 8	19	13,35	0,83	<0,001
E(1, 11/W5, 8)	HL-A 8	95	49,76	0,72	<0,001
E(1, 3/8, W14)	HL-A 8	19	13,35	0,83	<0,001
E(1, 2/5, 8)	HL-A 8	19	13,35	0,83	<0,001
E(1, -/8, -)	HL-A 8	19	13,35	0,83	<0,001
E(1, 11/8, 12)	HL-A 8	146	103,17	0,84	<0,001
E(1, 11/8, 12)	HL-A 8	19	13,35	0,83	<0,001

Tab. 5c. Ergebnisse der Absorptions- und Elutionsuntersuchungen
mit den Seren P-43 und P-54

Eluat	Antikörperspezifität	N	$\bar{x}^2$	r	p
P-43					
E(2, 9/12, W10)	W10 + W27	28	23,64	0,91	<0,001
	W10	25	19,79	0,88	<0,001
	W27	23	16,38	0,84	<0,001
E(2, -/13, W10)	W10 + W27	28	28,00	1,00	<0,001
	W10	25	25,00	1,00	<0,001
	W27	23	23,00	1,00	<0,001
E(2, 11/W10, -)	W10	28	28,00	1,00	<0,001
E(Gi2, -/W27, SL)	W27	19	19,00	1,00	<0,001
E(2, 10/5, 12)	HL-A 12	28	12,32	0,66	<0,001
E(2, 10/5, 12)	HL-A 12	94	14,08	0,38	<0,001
P-54					
E(1, 9/SL, Gi1)	HL-A 5 + 12 + SL	19	12,43	0,80	<0,001
E(2, 10/5, 12)	HL-A 5 + 12 + SL	19	12,43	0,80	<0,001
E(2, 3/5, 12)	HL-A 5 + 12 + SL	19	12,43	0,80	<0,001
E(2, 9/12, W10)	HL-A 5 + 12 + SL	19	12,43	0,80	<0,001
E(Gi2, -/W27, SL)	SL	19	11,92	0,79	<0,001
E(2, 9/12, W10)	HL-A 5 + 12 + SL	190	47,51	0,50	<0,001
	HL-A 5	148	38,83	0,51	<0,001
	HL-A 12 ?	147	3,23	0,14	<0,05 !
	SL	140	27,57	0,44	<0,001
E(2, 9/12, W10)	HL-A 5 + SL	146	118,71	0,90	<0,001
	HL-A 5	125	111,47	0,94	<0,001
	SL	121	90,59	0,86	<0,001
E(Gi2, -/W27, SL)	HL-A 5 + SL	146	59,30	0,63	<0,001
	HL-A 5	125	36,27	0,53	<0,001
	SL	121	31,07	0,50	<0,001

Dr. Colombani (Paris) ergaben, daß das Serum P53 in der MKBR das Antigen Ao28 definiert. Wir haben die Antikörperspezifität mit Gi2 bezeichnet.

Aus dem Serum P41 konnten drei Eluate mit der Spezifität Anti-HL-A 7 hergestellt werden. Die restlichen Eluate dieses Serums enthielten die kreuzreagierenden Antikörper Anti-HL-A 7 + W27.

Das Serum P50, das nach den Ergebnissen der Suchreaktion die Antikörperspezifität Anti-HL-A 3 + (1) enthielt, zeigte in den Eluaten die Antikörperspezifität Anti HL-A 3 mit und ohne Kreuzreaktion mit HL-A 1.

Durch Absorption und Elution ließen sich aus dem Serum P42 Antikörper gegen HL-A 7 + W10 und HL-A 8 gewinnen.

Bei Serum P43 (Anti-W10 + ?) gelang durch Absorption und Elution die vollständige Aufklärung der Antikörperspezifität. Es wurden Eluate mit der Spezifität Anti-W10 + W27, Anti-W10, Anti-W27 und Anti-HL-A 12 gewonnen.

Die Eluate des Serums P54 enthielten die kreuzreagierenden Antikörper Anti-HL-A 5 + SL und Anti-HL-A 5 + 12 + SL.

3. METHODISCHE UNTERSUCHUNG DER ABSORPTION UND ELUTION HL-A-SPEZIFISCHER ANTIKÖRPER MIT PLÄTTCHEN

Der Einfluß der Plättchenkonzentration, der Serummenge, der Temperatur und der Inkubationszeit bei der Absorption und des pH bei der Säureelution HL-A-spezifischer Antikörper mit Thrombozyten wurde systematisch untersucht. Zur Durchführung der Untersuchung diente ein bekanntes Anti-HL-A 2 Serum und entsprechende HL-A 2 Plättchen. Die hergestellten Eluate wurden in der MKBR gegen 5 Zellen, wovon 3 das Antigen HL-A 2 enthielten, durch Titration getestet. Die Untersuchungen wurden (bis auf den Vergleich des Einflusses verschiedener Temperaturen auf die Absorption über Nacht

und des pH bei der Säureelution) mit zwei verschiedenen Plättchen durchgeführt.

3.1. Einfluß der Plättchenkonzentration

Vergleicht man den Antikörpertiter des Eluates in Abhängigkeit von der zur Absorption verwandten Plättchenkonzentration, dann sieht man die in Abb. 7 wiedergegebene Beziehung. Mit 1×10^9 Plättchen wurden Eluate gewonnen, deren Endtiter 1:2 betrug, während die mit 2×10^9 , 3×10^9 und 6×10^9 Plättchen hergestellten HL-A 2-spezifischen Eluate in der Verdünnung 1:8 noch unterschiedlich starke C'-Fixationen zeigten.

3.2. Einfluß der Serummenge

Um den Einfluß der zur Absorption verwandten Serummenge auf den Antikörpertiter im Eluat zu testen, wurden 3×10^9 Plättchen mit 1 - $3 \times 0,5$ ml Antiserum inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 8 wiedergegeben. Bei dreimaliger Absorption mit 0,5 ml Antiserum wurden die höchsten Anti-HL-A 2-Titer im Eluat erreicht.

3.3. Einfluß der Temperatur

Um die Absorption von HL-A-spezifischen Antikörpern mit Plättchen in Abhängigkeit von der Temperatur zu untersuchen, wurden entsprechende Versuche bei 10° , 20° , 30° und 37° C durchgeführt. Wie in Abb. 9 zu sehen, wurden nur geringe Titerunterschiede der erhaltenen HL-A-spezifischen Eluate festgestellt. Der Vergleich der Absorptionen mit 60 min. Inkubation mit einer entsprechenden Inkubation über Nacht bei 4° C zeigt, daß durch das letztere Verfahren eine gering höhere Antikörperkonzentration im Eluat erzielt wurde. Es wurden deshalb Absorptionen über Nacht bei 4° , 20° , 37° C durchgeführt und untereinander sowie mit einer 60 min. Absorption bei 37° C verglichen (Abb. 10). Bei Vergleich der Antikörpertiter

Abb. 7. Einfluß der zur Absorption verwandten Plättchenkonzentration auf den Titer von Anti-HL-A 2 im Eluat (3x0,5 ml Serum, 60 min. bei 37° C; + 1x10⁹, ▲ 2x10⁹, ○ 3x10⁹, ◇ 6x10⁹ Plättchen)

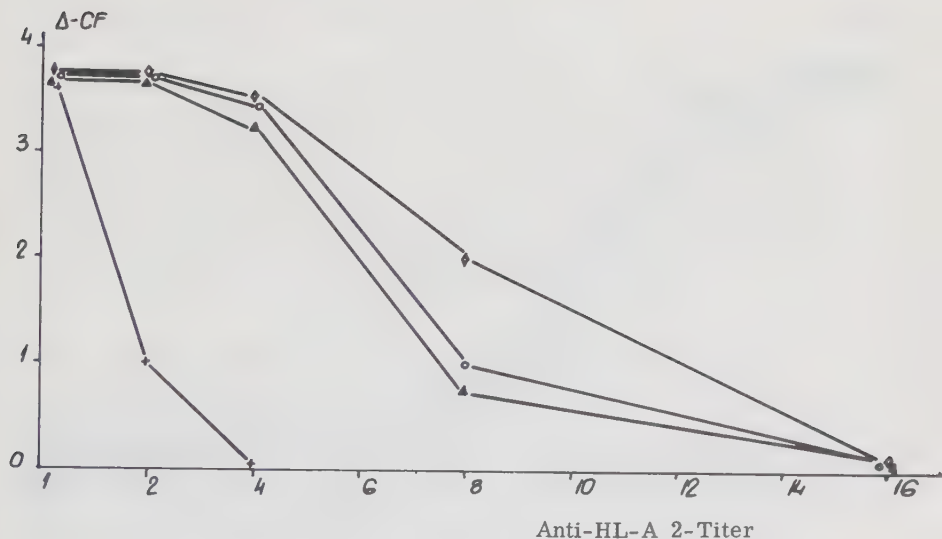


Abb. 8. Einfluß der zur Absorption verwandten Serummenge auf den Titer von Anti-HL-A 2 im Eluat (3x10⁹ Plättchen, 60 min. bei 37° C; □ 0,5 ml, ▼ 0,5+0,5 ml, ○ 0,5+0,5+0,5 ml Serum)

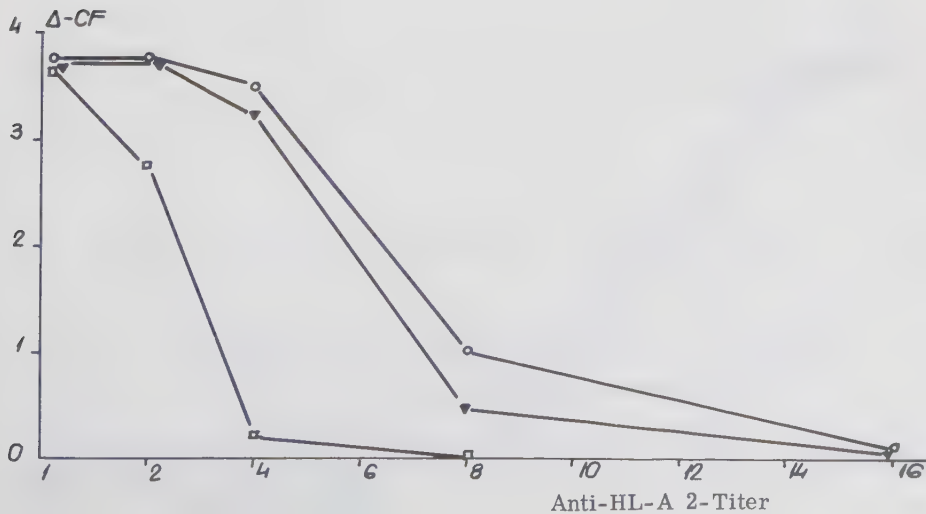


Abb. 9. Einfluß der Temperatur bei der Absorption von Anti-HL-A 2 auf den Antikörpertiter im Eluat (3x0,5 ml Serum, 3x10⁹ Plättchen 60 min. bei : ○ 37° C, ■ 30° C, △ 20° C, ● 10° C, x 37° C und über Nacht bei 4° C)

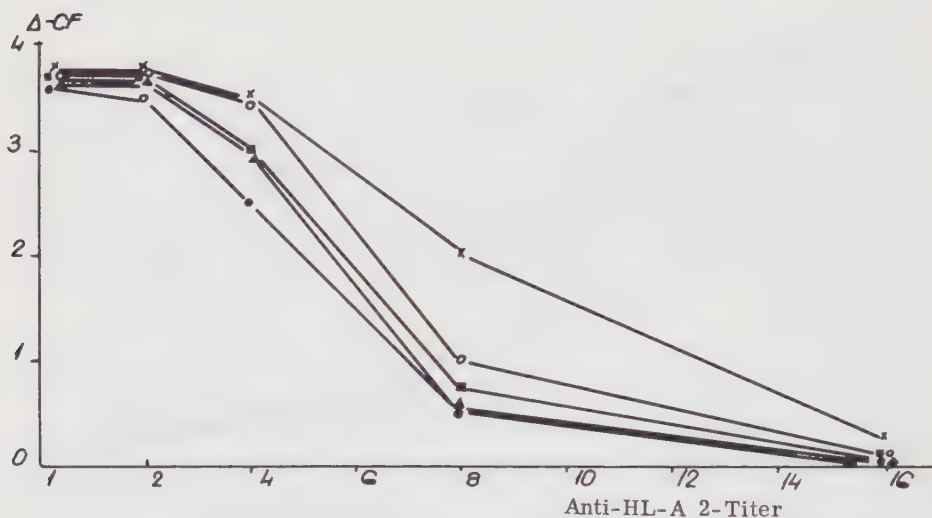
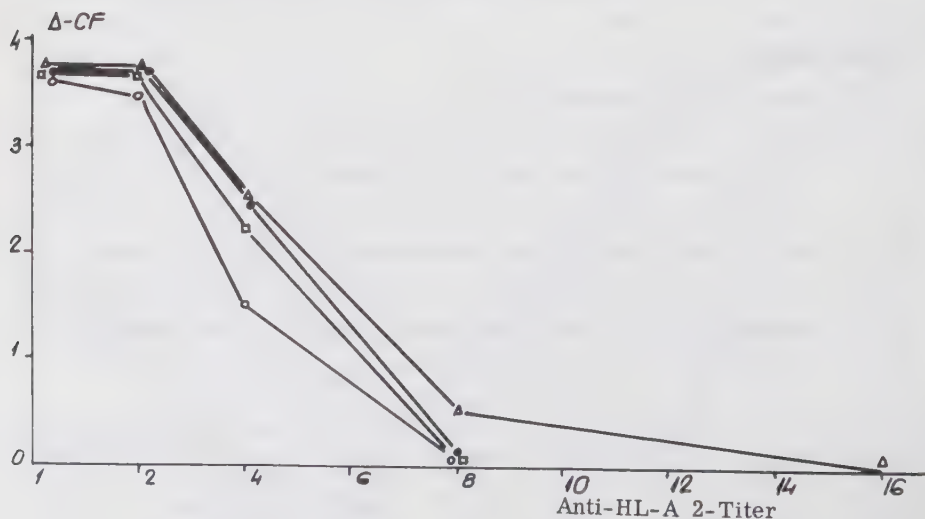


Abb. 10. Vergleich des Einflusses der Absorption über Nacht bei verschiedenen Temperaturen auf den Titer von Anti-HL-A 2 im Eluat (1,5 ml Serum, 3x10⁹ Plättchen; ○ 60' bei 37° C, △ über Nacht bei 4° C, ● über Nacht bei 20° C, ■ über Nacht bei 37° C)



in den Eluaten zeigte sich, daß die Absorption bei 4° C die größte Antikörperkonzentration im Eluat ergab.

3.4. Einfluß der Inkubationszeit

Die Abhängigkeit der Antikörperkonzentrationen im Eluat von der Inkubationszeit während der Absorption wird in Abb. 11 dargestellt. Man erkennt, daß die Verlängerung der Inkubationszeit während der Absorption von 10 auf 60 min. keine größere Antikörper-Ausbeute im Eluat bringt. Die Inkubation von 5 min. ergibt jedoch signifikant niedrigere Titer des Anti-HL-A 2-Antikörpers im Eluat.

3.5. Einfluß des pH bei der Säureelution von HL-A-spezifischen Antikörpern

Untersucht man den Einfluß des pH auf die Antikörperausbeute im Eluat bei der Säureelution, dann erhält man bei pH-Werten zwischen 3,0 - 3,5 die besten Ergebnisse (Abb. 12). Die Ansäuerung unter pH 3,0 ergab deutlich geringere Antikörperkonzentrationen im Eluat. Die Elution HL-A-spezifischer Antikörper bei pH-Werten über 3,5 führte ebenfalls zu einer geringen Antikörperausbeute im Eluat. Die bei der Neutralisation absichtlich überschießende Zugabe von NaOH und 10 min. Inkubation bei pH 8 bzw. pH 10 verändert die Antikörperkonzentration gering, wie in Abb. 13 zu sehen ist.

Die Versuche der Gewinnung HL-A-spezifischer Eluate über Wärme- bzw. Ätherelution ergaben kaum feststellbare Antikörperkonzentrationen in den Eluaten (Abb. 13).

4. TYPISIERUNG VON HL-A-ANTIGENEN AUF PLÄTTCHEN IN DER MKBR

Insgesamt wurden bei 423 unverwandten Blutspendern 7 HL-A-Antigene des 1. Locus und 13 Antigene des 2. Locus bestimmt. Die er-

Abb. 11. Abhängigkeit des Titers von Anti-HL-A 2 im Eluat von der Inkubationszeit während der Absorption (1,5 ml Serum, 3×10^9 Plättchen: + 5', $\circ$ 10', $\square$ 15', $\bullet$ 30', $\triangle$ 60' bei 37°C)

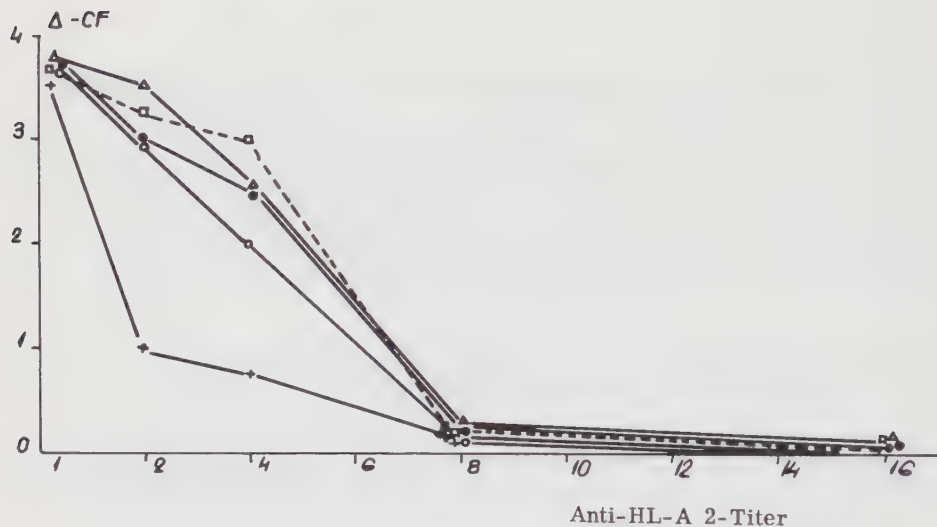


Abb. 12. Einfluß des pH bei der Säureelution auf den Titer von Anti-HL-A 2 im Eluat (Absorption mit 1,0 ml Serum, 3×10^9 Plättchen, bei 37°C , 60 min.; Säureelution bei pH: $\circ$ 3,0, $\bullet$ 3,5, $\triangle$ 4,0, ∇ 4,5, $\blacktriangledown$ 5,0, $\times$ 1,5, $\square$ 2,0, $\blacksquare$ 2,5; — pH ≥ 3 , --- pH < 3)

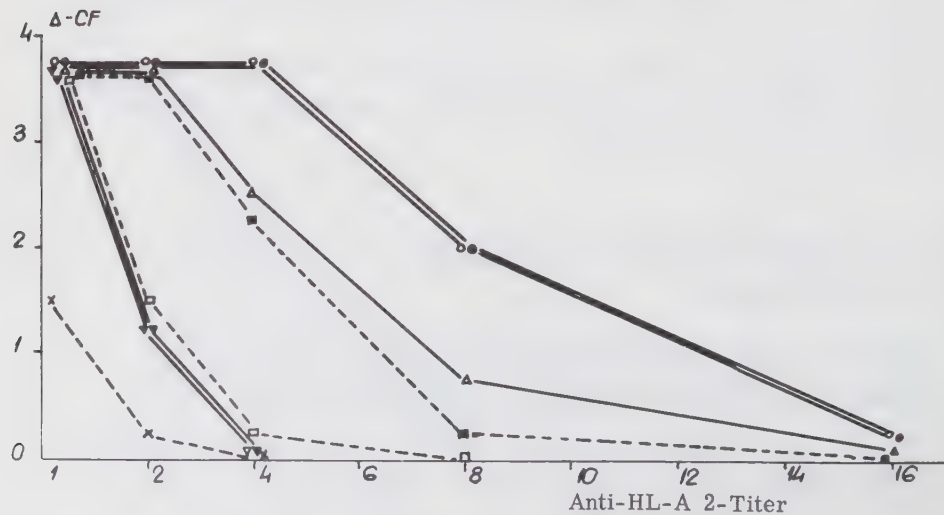
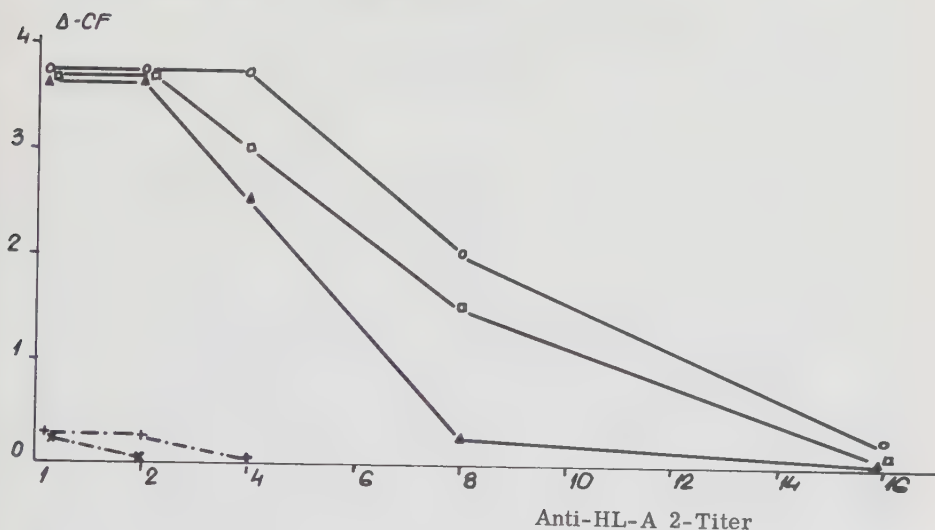


Abb. 13. Einfluß der Inkubation des Eluates während 10 min., nach der Säureelution, bei pH 8,0 und 10,0 auf den Titer von Anti-HL-A 2 im Eluat. Titer von Anti-HL-A 2 im Eluat nach Wärme und Ätherelution (Elution bei pH 3,0; ○ Neutralisation bei pH 7,0, □ 10 min. Inkubation bei pH 8,0, △ 10 min. Inkubation bei pH 10,0, + Wärme-Eluat, x Äther-Eluat)



mittelten Phänotypfrequenzen bzw. Genotypfrequenzen der typisierten Antigene sind in Tab. 6 zusammengestellt. Am häufigsten war HL-A 2, mit einer Genfrequenz von 0,301 und am seltensten W22, mit einer Genfrequenz von 0,010 vertreten.

Die Auswertung von 423 Plättchentypisierungen hinsichtlich der Anzahl bestimmter HL-A-Antigene auf der Oberfläche ergab folgende Verteilung: In 29,8 % der Typisierungen konnten alle 4 HL-A-Antigene bestimmt werden, in 42,8 % konnten 3 Antigene, in 23,2 % der Fälle 2 Antigene, in 3,5 % der Typisierungen 1 Antigen und in 0,7 % der Fälle kein HL-A-Antigen typisiert werden (Abb. 7).

Beim Vergleich der in der MKBR erhaltenen Typisierungsergebnisse mit den Typisierungen der Lymphozyten der gleichen Spender in der MLTox, zeigte sich bei 14 der in beiden Methoden bestimmten Antigene (HL-A 1, 2, 9, 11, Gi2, HL-A5, 7, 13, W5, W10, W14, W15, W22, W27) eine Übereinstimmung der Ergebnisse größer als 98 %. Die Typisierung der Antigene HL-A 3, W28, HL-A 12, SL und Gi1 zeigte bei Vergleich der Ergebnisse in beiden Mikromethoden eine Diskordanz von über 2 % (Tab. 8).

Die Auswertung der Reaktionen aller zur HL-A-Typisierung in der Plättchen-MKBR benutzten Eluate ergibt, daß 153 der verwendeten Eluate mit den entsprechenden Typisierungsergebnissen in der MKBR und MLTox eine hochsignifikante Übereinstimmung ($p < 0,001$) zeigen. 2 Eluate (E486 und E499) definieren das Antigen HL-A 5 aufgrund von Kreuzreaktionen mit HL-A 12 +SL bzw. eines zweiten Antikörpers (Anti-HL-A 9) mit Irrtumswahrscheinlichkeit von "nur" 1 % ($p < 0,01$). Das Eluat E592 definiert HL-A 12 lediglich mit einer Sicherheit von $p < 0,025$. 6 Eluate (E448, E506, E676, E894, E605, E734) stellten sich bei der retrospektiven Auswertung für die HL-A-Typisierung von Antigenen auf Plättchen in der MKBR als nicht brauchbar heraus. Die Auswertung jedes zur HL-A-Typisierung verwendeten Eluates ist, nach Spezifitäten geordnet, in Tab. 9 (a-i) zusammengestellt.

Tab. 6. Phänotyp- und Genfrequenzen von HL-A-Antigenen bei
423 unverwandten Blutspendern

Antigen	N	Phänotyp- frequenz	Genfrequenz nach Typisierungser- gebnissen in der MKBR	Vergleich mit Gen- frequenzberechnungen von Dausset, Svejgaard et al., Mattiuz et al., Mayr u. Eurotransplant
HL-A 1	413	0,232	0,124	(0,123 - 0,181)
HL-A 2	415	0,511	0,301	(0,249 - 0,358)
HL-A 3	408	0,252	0,135	(0,110 - 0,157)
HL-A 9	417	0,197	0,104	(0,109 - 0,146)
HL-A 11	415	0,079	0,040	(0,047 - 0,067)
W28	423	0,066	0,034	(0,040 - 0,066)
Gi-2	422	0,076	0,039	(0,083 - (Ao28))
X ₁	417		0,182	(0,180 - nach Dausset Nov. 1971 - ohne Da22 und Da25)
HL-A 5	418	0,146	0,076	(0,039 - 0,127)
HL-A 7	416	0,272	0,147	(0,073 - 0,173)
HL-A 8	404	0,176	0,092	(0,065 - 0,153)
HL-A 12	374	0,083	0,042	(0,092 - 0,161)
HL-A 13	419	0,074	0,038	(0,011 - 0,049)
W5	419	0,143	0,074	(0,069 - 0,117)
W10	419	0,134	0,069	(0,046 - 0,118)
W14	420	0,052	0,026	(0,019 - 0,043)
W15	423	0,139	0,072	(0,043 - 0,095)
W22	421	0,019	0,010	(0,014 - 0,028)
W27	417	0,062	0,031	(0,029 - 0,069)
SL?	417	0,125	0,065	(0,050 - 0,058)
Gi-1	417	0,074	0,038	(0,091 - (CM))
X ₂	414		0,220	(0,157 - nach Dausset Nov. 1971 - ohne Da(6), Da24, Da30 und Da31)

Tab. 7. Auswertung der 423 Plättchentypisierungen in der MKBR
hinsichtlich der Anzahl bestimmter HL-A-Antigene

<u>Anzahl der be-</u> <u>stimmten HL-A-</u> <u>Antigene</u>	<u>Anzahl der Typi-</u> <u>sierungen in der</u> <u>Plättchen-MKBR</u>	<u>Prozent der</u> <u>Gesamtypi-</u> <u>sierungen</u>
4 Antigene ("Full-house")	126	29,8 %
3 Antigene	181	42,8 %
2 Antigene	98	23,2 %
1 Antigen	15	3,5 %
Kein Antigen	3	0,7 %

Tab. 8. Vergleich der HL-A-Typisierungsergebnisse von 423 unverwandten Blutspendern in der MKBR und der MLTox

Antigen	N	MKBR / MLTox				Diskordanz %	
		+/+	-/-	+/-	-/+	≤ 2 %	≥ 2 %
HL-A 1	420	96	317	6	1	1,66	
HL-A 2	416	212	204	0	1	0,24	
HL-A 3	417	103	305	7	2		2,15
HL-A 9	420	82	335	2	1	0,71	
HL-A 11	420	33	382	1	4	1,19	
W 28	421	9	395	17	0		4,03
Gi-2	112	13	98	0	1	0,89	
HL-A 5	421	61	357	1	2	0,71	
HL-A 7	419	113	303	0	3	0,71	
HL-A 8	422	68	333	2	19		4,97
HL-A 12	421	30	343	1	47		11,40
HL-A 13	420	31	388	1	0	0,23	
W 5	423	60	359	1	3	0,23	
W 10	421	56	363	1	1	0,47	
W 14	423	22	398	2	1	0,70	
W 15	420	51	364	5	0	1,19	
W 22	422	5	413	2	2	0,94	
W 27	422	26	391	2	3	1,18	
SL?	422	32	365	19	6		5,92
Gi-1	112	5	97	4	6		8,92

Tab. 9a. Auswertung der zur HL-A-Typisierung in der Plättchen-MKBR verwendeten Eluate

Eluat (Verdünnung)	Ausgangs- serum	HL-A- Spezi- fität	N	χ^2	r	p
E(1,2/W15,-)	S-489	1	94	56,54	0,77	<0,001
E(1,3/W5,-)	S-489	1	95	53,78	0,75	<0,001
E(1,Li/8,W15)	S-489	1	98	69,22	0,84	<0,001
E(1,3/W5,-)	S-489	1 + ?	192	50,12	0,51	<0,001
E(1,9/SL,-)(1,3/W5)	S-489	1	146	113,99	0,88	<0,001
E(1,11/8,W5)	S-254	1	94	89,18	0,97	<0,001
E(1,-/13,W10)	S-1413	1	98	83,90	0,92	<0,001
E(1,Li/8,W15)(1:1,5)	S-1413	1	146	135,61	0,96	<0,001
E(1,11/W5,W15)(1:1,5)	P-15	1 + 3	94	90,07	0,97	<0,001
		1	68	63,62	0,96	<0,001
		3	67	62,56	0,96	<0,001
E(1,11/W5,W15)(1:1,5)	P-15	1 + 3	192	188,04	0,98	<0,001
		1	137	132,28	0,98	<0,001
		3	146	141,60	0,98	<0,001
E(1,3/W5,8)(1:1,5)	P-15	1 + 3	146	120,01	0,90	<0,001
		1	108	74,48	0,83	<0,001
		3	111	111,00	1,00	<0,001
E(2,10/7,12)	S-1365	-1?	192	37,03	0,43	<0,001
E(1,11/W5,8)(1:1,5)	S-1365	1	146	140,66	0,98	<0,001
E(1,11/W5,8)(1:1,5)	S-1365	1 + 11	146	120,08	0,90	<0,001
		1	133	133,00	1,00	<0,001
		11	111	52,32	0,68	<0,001
E(1,9/SL,-)	S-1365	1	192	176,03	0,95	<0,001
E(W25,11/13,W22)	S-1365	1 + 11	95	75,49	0,89	<0,001
		1	91	75,20	0,90	<0,001
		11	73	22,61	0,55	<0,001

Tab. 9b. Auswertung der zur HL-A-Typisierung in der Plättchen-MKBR verwendeten Eluate

Eluat (Verdünnung)	Ausgangs-Serum	HL-A-Spezifität	N	χ^2	r	p
E(2, -/W14, SL)	P-18	2	94	86,16	0,95	<0,001
E(2, 3/W27, W15)	P-18	2	95	87,30	0,95	<0,001
E(2, -/5, 7)	P-18	2	98	94,08	0,97	<0,001
E(2, -/5, -)	P-18	2	146	142,03	0,98	<0,001
E(2, -/W15, -)	Tz-18	2	94	82,41	0,93	<0,001
E(1, 2/8, W15)	P-19	2	94	90,08	0,97	<0,001
e(2, 3/7, -)	P-19	2	95	91,07	0,97	<0,001
E(2, -/5, 12)	P-19	2	98	90,31	0,96	<0,001
E(2, -/-, W15)	Tz-58	2	146	142,03	0,98	<0,001
E(2, 10/7, 12)(1:1, 5)	S-25	2	146	142,03	0,98	<0,001
E(W28, -/W27, -)	S-55	2 + W28	94	85,99	0,95	<0,001
		2	88	80,11	0,95	<0,001
		W28	46	38,44	0,91	<0,001
E(W28, -/W5, -)	S-55	2 + W28	95	91,02	0,97	<0,001
		2	91	87,05	0,97	<0,001
		W28	46	35,92	0,88	<0,001
E(2, 3/W27, W15)	S-55	2 + W28	98	86,37	0,93	<0,001
		2	90	78,65	0,93	<0,001
		W28	50	33,76	0,82	<0,001
E(1, 2/8, W15)	S-1214	2 + W28	94	85,99	0,95	<0,001
		2	88	80,11	0,95	<0,001
		W28	46	38,44	0,91	<0,001
E(W28, -/W27, -)	S-1214	2 + W28	95	95,00	1,00	<0,001
		2	91	91,00	1,00	<0,001
		W28	46	46,00	1,00	<0,001
E(2, 3/5, 12)	S-1214	2 + W28	98	93,98	0,97	<0,001
		2	90	86,06	0,97	<0,001
		W28	50	43,38	0,93	<0,001
E(1, 2/8, W15)	S-1214	2 + W28	146	141,81	0,98	<0,001
		2	134	129,94	0,98	<0,001
		W28	68	61,64	0,95	<0,001
E(2, -/12, -)(1:1, 5)	S-919	W28 + 2	94	37,76	0,63	<0,001
		W28	46	30,05	0,80	<0,001
		2	88	34,42	0,62	<0,001
E(W28, -/W27, -)(1:1, 5)	S-919	W28 + 2	98	32,42	0,57	<0,001
		W28	50	50,00	1,00	<0,001
		2	90	25,47	0,53	<0,001
E(2, -/12, -)(1:2)	S-919	W28	95	29,96	0,56	<0,001

Tab. 9c. Auswertung der zur HL-A-Typisierung in der Plättchen-MKBR verwendeten Eluate

Eluat (Verdünnung)	Ausgangs- serum	HL-A-Spezi- fität	N	x^2	r	p
E(2, 3/W27, W15)	P-15	3	94	89,28	0,97	<0,001
E(2, 3/W27, W15)	Tz-46	3	281	281,00	1,00	<0,001
E(3, -/7, W15)	Tz-46	3	146	135,79	0,96	<0,001
E(3, -/W14, -)	S-1247	3	94	94,00	1,00	<0,001
E(3, -/W14, -)	S-1247	3	192	161,61	0,91	<0,001
E(3, -/W14, -)(1:1, 5)	S-1247	3	146	140,93	0,98	<0,001
E(1, 2/5, 8)(2, -/5, 12)	S-456	5	94	62,01	0,81	<0,001
E(3, -/5, W27)	S-456	5	95	95,00	1,00	<0,001
E(2, -/5, 12)	S-456	5	98	83,70	0,92	<0,001
E(3, 10/5, 7)(1:2)	S-456	5	146	132,24	0,95	<0,001
E(2, -/5, -)	S-379	5	94	94,00	1,00	<0,001
E(1, 2/5, 8)	S-379	5	192	176,27	0,95	<0,001
E(1, 2/5, 8)(1:3)	S-379	5	146	132,13	0,95	<0,001
E(W28, -/W5, 12)	S-751	5	94	94,00	1,00	<0,001
E(3, 9/7, W15)	S-751	5 + 9	94	29,34	0,55	<0,001
		5	73	7,20	0,31	<0,01 !
		9	85	38,50	0,67	<0,001
E(2, 3/5, 12)	S-743	5 + W5	94	87,62	0,96	<0,001
		5	86	76,39	0,94	<0,001
		W5	85	74,57	0,93	<0,001
E(1, 2/W5, -)	S-743	5 + W5	192	168,92	0,93	<0,001
		5	162	128,12	0,88	<0,001
		W5	164	157,52	0,97	<0,001
E(1, 2/W5, -)(1:3)	S-743	W5	146	126,58	0,93	<0,001
E(1, 11/W5, 8)	S-955	W5	85	21,17	0,49	<0,001
E(1, 11/W5, 8)	S-423	W5	94	94,00	1,00	<0,001
E(1, 3/W5, 8)(1:2)	S. 423	W5	192	116,02	0,77	<0,001
E(1, 3/W5, W22)(1:1, 5)	S-423	W5	146	106,54	0,85	<0,001
E(1, 2/W5, -)(W28, -/W5, -)	S-1316	W5	192	50,99	0,51	<0,001

Tab. 9d. Auswertung der zur HL-A-Typisierung in der Plättchen-MKBR verwendeten Eluate

Eluat (Verdünnung)	Ausgangs- serum	HL-A- Spezi- fität	N	x ²	r	p
E(1, 2/5, 8)	S-1043	5 + SL	94	25,73	0,52	<0,001
		5	59	9,88	0,40	<0,01 !
		SL	69	23,49	0,58	<0,001
E(-, 9/7, SL)	S-1043	5+12+SL	192	56,20	0,54	<0,001
		5	150	43,08	0,53	<0,001
		12	149	6,32	0,20	<0,025
		SL	142	30,85	0,46	<0,001
E(1, 2/5, 8)(1:1, 5)	S-1043	5+SL	192	59,42	0,55	<0,001
		5	175	38,32	0,46	<0,001
		SL	164	60,27	0,60	<0,001
E(2, 10/5, 12)	S-1079	5+SL	94	57,90	0,78	<0,001
		5	77	31,10	0,63	<0,001
		SL	85	45,64	0,73	<0,001
E(2, 10/5, 12)(1:2)	S-1079	5+SL	192	121,04	0,79	<0,001
		5	175	138,23	0,88	<0,001
		SL	164	43,77	0,51	<0,001
E(2, 9/12, W10)	P-54	5+SL	190	47,51	0,50	<0,001
		5	148	38,83	0,51	<0,001
		SL	140	27,57	0,44	<0,001
E(2, 9/12, W10)	P-54	5+SL	146	118,71	0,90	<0,001
		5	125	111,47	0,94	<0,001
		SL	121	90,59	0,86	<0,001
E(Gi2, -/W27, SL)	P-54	5+SL	146	59,30	0,63	<0,001
		5	125	36,27	0,53	<0,001
		SL	121	31,07	0,50	<0,001
E(3, 9/W5, W15)(1:2)	029	5+W15+W5	281	226,46	0,89	<0,001
		5	204	140,00	0,82	<0,001
		W15	206	168,22	0,90	<0,001
		W5	201	187,55	0,96	<0,001
E(3, 9/W5, W15)(1:3)	029	5+W5+W15	192	142,76	0,86	<0,001
		5	136	88,57	0,80	<0,001
		W5	135	104,31	0,87	<0,001
		W15	134	79,24	0,76	<0,001

Tab. 9e. Auswertung der zur HL-A-Typisierung in der Plättchen-MKBR
verwendeten Eluate

Eluat (Verdünnung)	Ausgangs- serum	HL-A- Spezi- fität	N	χ^2	r	p
E(3, -/7, 8)(1, 9/7, SL)	Tz-18	7	94	88,95	0,97	<0,001
E(3, -/7, W15)(1:3)	Tz-18	7	146	146,00	1,00	<0,001
E(2, 3/7, -)	Tz-60	7	94	94,00	1,00	<0,001
E(W28, -/W5, 12)	Tz-60	7	95	90,35	0,97	<0,001
E(1, 9/7, SL)	Tz-60	7	98	98,00	1,00	<0,001
E(W28, -/W27, W14)(1:4)	Tz-60	7 + W27	146	141,35	0,98	<0,001
		7	138	132,95	0,98	<0,001
		W27	107	107,00	1,00	<0,001
E(3, -/7, 8)(1:3)	Tz-23	7	281	266,37	0,97	<0,001
E(2, 9/12, W10)(1:1, 5)	S-1044	7	146	140,93	0,98	<0,001
E(W28, -/W27, W14)	P-41	7 + W27	94	94,00	1,00	<0,001
		7	84	84,00	1,00	<0,001
		W27	69	69,00	1,00	<0,001
E(Gi2, -/W27, SL)	P-41	7 + W27	192	179,19	0,96	<0,001
		7	179	179,00	1,00	<0,001
		W27	137	102,89	0,86	<0,001
E(Gi2, -/W27, SL)	S-1012	W27	94	94,00	1,00	<0,001
E(Gi2, -/W27, SL)	S-1012	W27	192	143,54	0,86	<0,001
E(Gi2, -/W27, SL)	S-1012	W27	146	146,00	1,00	<0,001
E(1, -/13, W10)	S-1471	13 + W27	192	162,34	0,91	<0,001
		13	179	146,43	0,90	<0,001
		W27	176	123,25	0,83	<0,001
E(-, -/7, 13)	S-1471	13 + W27	146	122,20	0,91	<0,001
		13	138	103,66	0,86	<0,001
		W27	136	96,59	0,84	<0,001
E(1, 3/8, -)	P-42	8	94	45,95	0,69	<0,001
E(1, 2/8, W15)	P-42	8	94	45,95	0,69	<0,001
E(1, 11/W5, 8)	P-42	8	95	49,76	0,72	<0,001
E(1, 2/8, W15)	P-42	8	98	55,10	0,74	<0,001
E(1, 11/8, 12)(1:1, 25)	P-42	8	146	103,17	0,84	<0,001

Tab. 9f. Auswertung der zur HL-A-Typisierung in der Plättchen-MKBR
verwendeten Eluate

Eluat (Verdünnung)	Ausgangs- serum	HL-A- Spezi- fität	N	χ^2	r	p
E(-, 9/8, SL)	P-10	9	94	88,49	0,97	<0,001
E(-, 9/8, SL)	P-10	9	192	192,00	1,00	<0,001
E(-, 9/8, SL)	P-10	9	146	139,77	0,97	<0,001
E(-, 9/8, SL)(1:1, 5)	Tz-58	9	94	94,00	1,00	<0,001
E(3, 9/W5, W15)(1:1, 5)	Tz-58	9	146	139,77	0,97	<0,001
E(2, 9/13, SL)	S-1240	9	94	94,00	1,00	<0,001
E(2, 9/13, SL)	S-1240	9	94	57,18	0,77	<0,001
E(2, 9/13, SL)	S-1240	9	192	176,10	0,95	<0,001
E(2, 9/13, SL)	S-1240	9	146	117,78	0,89	<0,001
E(3, 11/W10, -)(1:1, 5)	P-25	11	94	29,40	0,55	<0,001
E(3, 11/W10, -)	P-25	11	192	157,28	0,90	<0,001
E(3, 11/W10, -)	P-25	11	146	146,00	1,00	<0,001
E(3, 11/W10, -)	P-25	11	146	22,15	0,38	<0,001
E(2, 11/-, SL)(1:1, 5)	S-591	11	94	94,00	1,00	<0,001
E(2, 11/-, SL)(1:1, 5)	S-591	11	192	192,00	1,00	<0,001
E(2, 11/-, SL)(1:1, 5)	S-591	11	146	146,00	1,00	<0,001
E(2, 10/5, 12)	P-43	12	94	14,08	0,38	<0,001
E(2, 10/5, 12)(1:4)	S-1479	12	146	55,17	0,61	<0,001
E(2, 10/5, 12)	S-1479	12	149	14,11	0,30	<0,001
E(2, -/13, W10)	S-487	13	94	20,61	0,46	<0,001
E(2, -/13, W10)	S-487	13	192	192,00	1,00	<0,001
E(2, -/13, W10)	S-487	13	146	146,00	1,00	<0,001
E(2, -/13, W15)(1:2)	S-1509	13	146	132,84	0,95	<0,001

Tab. 9g. Auswertung der zur HL-A-Typisierung in der Plättchen-MKBR
verwendeten Eluate

Eluat (Verdünnung)	Ausgangs- serum	HL-A- Spezi- fität	N	x ²	r	p
E(2, 9/12, W10)	S-1044	13 + W10	94	74,50	0,89	<0,001
		13	86	55,18	0,80	<0,001
		W10	86	55,18	0,80	<0,001
E(2, 9/12, W10)	S-1044	13 + W10	192	165,46	0,92	<0,001
		13	166	120,37	0,85	<0,001
		W10	176	141,81	0,89	<0,001
E(2, 9/12, W10)	S-1044	W10	146	93,19	0,79	<0,001
E(3, 11/W10, -)(1:3)	087	13 + W10	281	274,67	0,98	<0,001
		13	247	234,20	0,97	<0,001
		W10	257	257,00	1,00	<0,001
E(2, 9/12, W10)	S-747	13 + W10	192	156,39	0,90	<0,001
		13	166	107,93	0,80	<0,001
		W10	176	131,12	0,86	<0,001
E(2, 9/12, W10)	S-747	13 + W10	146	146,00	1,00	<0,001
		13	119	119,00	1,00	<0,001
		W10	135	135,00	1,00	<0,001
E(2, 9/12, W10)	S-747	W10	94	65,97	0,83	<0,001
E(3, -/7, 8)(1:2)	Tz-23	13 + W10	146	101,52	0,83	<0,001
		13	119	42,93	0,60	<0,001
		W10	135	105,22	0,88	<0,001
E(-, 10/7, 8)	S-1196	7 + W10	94	94,00	1,00	<0,001
		7	86	86,00	1,00	<0,001
		W10	69	69,00	1,00	<0,001
E(3, 11/W10, -)	S-1196	7 + W10	192	183,97	0,97	<0,001
		7	166	157,21	0,97	<0,001
		W10	137	124,58	0,95	<0,001
E(3, 11/W10, -)(1:4)	S-1196	W10 + 7	146	60,32	0,64	<0,001
		W10	107	101,76	0,97	<0,001
		7	119	21,90	0,42	<0,001

Tab. 9h. Auswertung der zur HL-A-Typisierung in der Plättchen-MKBR verwendeten Eluate

Eluat (Verdünnung)	Ausgangserum	HL-A-Spezifität	N	χ^2	r	p
E(1, 2/8, W15)(1:2)	P-29	W15 + SL	146	111,23	0,87	<0,001
		W15	125	125,00	1,00	<0,001
		SL	129	78,79	0,78	<0,001
E(-, -, /7, 13)	S-1106	W15 + SL	192	75,09	0,62	<0,001
		W15	175	96,52	0,74	<0,001
		SL	163	30,15	0,43	<0,001
E(Gi2, -/W27, SL)	S-1106	W15 + SL	94	61,75	0,81	<0,001
		W15	77	71,02	0,96	<0,001
		SL	79	36,43	0,67	<0,001
E(-, -, /7, 13)	S-1106	W15	77	46,57	0,77	<0,001
E(3, -, /7, W15)	S-258	W15	94	94,00	1,00	<0,001
E(3, 9/7, W15)	S-258	W15	95	64,82	0,82	<0,001
E(3, 11/7, W15)	S-258	W15	98	79,50	0,90	<0,001
E(3, -, /7, W15)	S-258	W15	146	90,25	0,78	<0,001
E(3, 9/W5, W15)	P-29	W15 + SL	94	65,98	0,83	<0,001
		W15	77	77,00	1,00	<0,001
		SL	79	41,75	0,72	<0,001
E(Gi2, -/W27, SL)	P-29	W15 + SL	95	45,63	0,69	<0,001
		W15	88	27,24	0,55	<0,001
		SL	85	52,09	0,78	<0,001
E(1, 2/8, W15)	P-29	W15 + SL	98	88,23	0,94	<0,001
		W15	88	81,94	0,96	<0,001
		SL	79	58,55	0,86	<0,001
E(1, 2/8, W15)	S-1106	W15 + SL	95	81,87	0,92	<0,001
		W15	88	78,97	0,94	<0,001
		SL	85	60,59	0,84	<0,001
E(1, 9/SL, -)	S-1106	W15 + SL	98	88,25	0,94	<0,001
		W15	88	88,00	1,00	<0,001
		SL	79	57,62	0,85	<0,001
E(-, -, /7, 13)	S-1106	W15 + W22	94	87,33	0,96	<0,001
		W15	93	86,06	0,96	<0,001
		W22	79	38,99	0,70	<0,001
E(3, 9/7, W15)	0,29	W15 + W10	146	114,74	0,88	<0,001
		W15	119	84,95	0,84	<0,001
		W10	129	90,16	0,83	<0,001
E(1, Li/8, W15)(1:2)	0,29	W15 + SL	146	47,35	0,56	<0,001
		W15	125	34,99	0,52	<0,001
		SL	129	23,19	0,42	<0,001

Tab. 9i. Auswertung der zur HL-A-Typisierung in der Plättchen-MKBR verwendeten Eluate

Eluat (Verdünnung)	Ausgangs- serum	HL-A-Spezi- fität	N	χ^2	r	p
E(2, 9/W27, SL)	S-288	SL	94	50,27	0,73	<0,001
E(2, 9/W27, SL)	S-288	SL	94	46,18	0,70	<0,001
E(2, 9/W27, SL)(1:3)	S-288	SL	192	99,17	0,71	<0,001
E(2, 9/W27, SL)(1:3)	S-288	SL	146	59,52	0,63	<0,001
E(W28, -/W27, W14)(1:3)	S-1055	W14	281	281,00	1,00	<0,001
E(2, -/W14, SL)(1:3)	S-1055	W14	94	77,45	0,90	<0,001
E(2, 11/5, 7)	S-1055	W14	95	78,28	0,90	<0,001
E(2, -/W15, -)	S-1055	W14	98	71,90	0,85	<0,001
E(3, -/W14, -)(1:2)	S-1055	W14	146	98,12	0,81	<0,001
E(3, -/W14, -)	S-1055	W14	146	146,00	1,00	<0,001
E(1, 3/W5, W22)	S-1355	W22	95	46,47	0,69	<0,001
E(1, 3/W5, W22)	S-1355	W22	146	22,64	0,39	<0,001
E(1, 9/SL, Gi1)	S-977	Gi1	192	35,60	0,43	<0,001
E(1, 9/SL, Gi1)(1:3)	S-977	Gi1	146	72,78	0,70	<0,001
E(2, 10/W14, Gi1)	S-1215	Gi1	192	192,00	1,00	<0,001
E(2, -/W14, Gi1)(1:3)	S-1215	Gi1	146	28,70	0,44	<0,001
E(1, 9/SL, Gi1)	S-977	Gi1	94	94,00	1,00	<0,001
E(Gi2, -/W27, SL)(1:4)	P-53	Gi2	149	149,00	1,00	<0,001
E(Gi2, -/W27, SL)(1:2)	P-53	Gi2	146	146,00	1,00	<0,001
E(Gi2, -/W27, SL)(1:2)	P-53	Gi2	146	146,00	1,00	<0,001
E(3, 9/W5, W15)	P-53	Gi2	41	15,75	0,61	<0,001

5. EINFLUSS VON ENZYMEN AUF HL-A-ANTIGENE VON THROMBOZYTEN

Vergleicht man enzymatisch vorbehandelte mit unbehandelten Plättchen, indem man den Antikörpertiter spezifischer, gegen HL-A-Antigene dieser Plättchen gerichteter Antiseren bestimmt, dann erhält man folgende Ergebnisse:

Die Plättchen (I) des Spenders Drebert (1,9 / SL, Gil) zeigten sowohl nach Neuraminidase - als auch nach Subtilisinbehandlung deutlich schwächere Reaktionen mit den entsprechenden spezifischen HL-A-Antiseren im Vergleich zur unbehandelten Plättchensuspension (Abb. 14).

Die Plättchenantigene des Spenders Reinhard (2,3 / W27, W15) zeigten keine Abschwächung mit Pronase, hingegen eine deutliche Abschwächung der spezifischen Antigen-Antikörperreaktion bei den mit Neuraminidase behandelten Zellen (Abb. 15).

Bei dem Plättchen Drebert als auch dem Plättchen Reinhard dienen als Kontrolle diejenigen Plättchen, die im Kühlschrank in Gießen verblieben waren, also keinerlei "Reisestress" bzw. Alteration durch weitere Waschvorgänge erfahren hatten. Um diese unspezifische Wirkung auf HL-A-Antigene von Plättchen von einer spezifischen Wirkung durch Enzyme zu unterscheiden, wurden im folgenden die Kontrollen jeweils mit Plättchen durchgeführt, die eine vergleichbare unspezifische Behandlung erfahren hatten.

Der auf diese Weise durchgeführte Vergleich der Antigene HL-A 3 und W5 der mit Neuraminidase und Pronase behandelten Plättchen des Spenders Nagel (3,9/W5, W15) zeigte, daß gegenüber der Kontrolle (mitgeschickte, unbehandelte Plättchensuspension) eine geringe Antigenabschwächung festzustellen war. Die Antigene HL-A 9 und W15 zeigten dagegen keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Ergebnissen mit Kontrollplättchen (Abb. 16).

Die Auswertung der Ergebnisse einer anderen Plättchensuspension des Spenders Queckbörner (1,2/5,8) ergab nach Neuraminidasebehand-

Abb. 14. Einfluß enzymatischer Behandlung auf die HL-A-Antigene der Plättchen (I) des Spenders Drebert (1,9/SL, Gil)
(o in Giessen verbliebene Stammsuspension, ▲ Neuraminidasebehandlung, □ Subtilisinbehandlung)

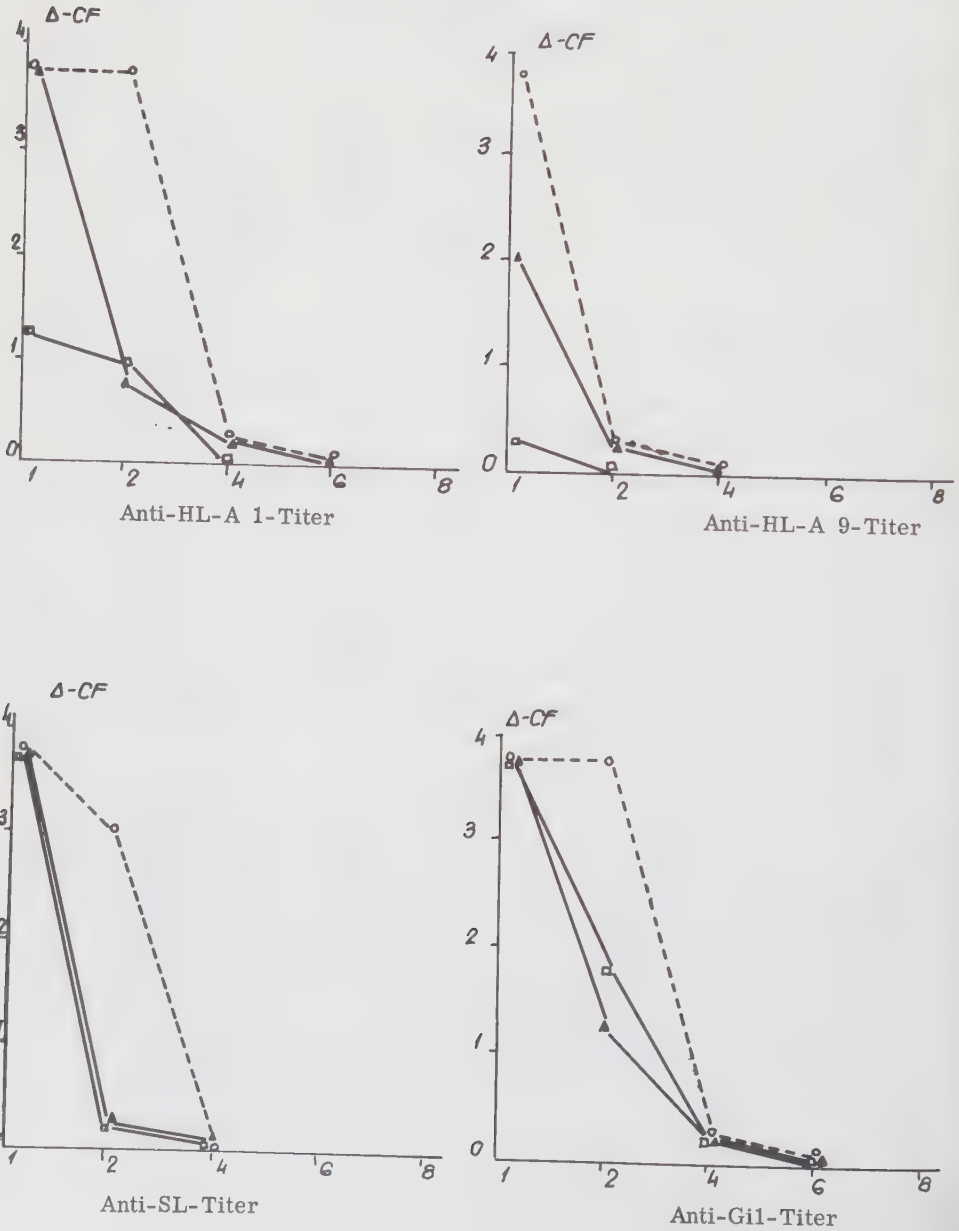


Abb. 15. Einfluß enzymatischer Behandlung auf die HL-A-Antigene der Plättchen des Spenders Reinhard (2, 3/W27, W15)

(o in Giessen verbliebene Stammsuspension, ▲ Neuraminidasebehandlung, ▼ Pronasebehandlung)

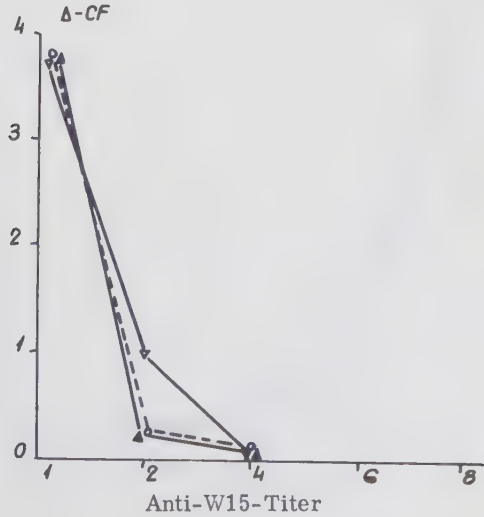
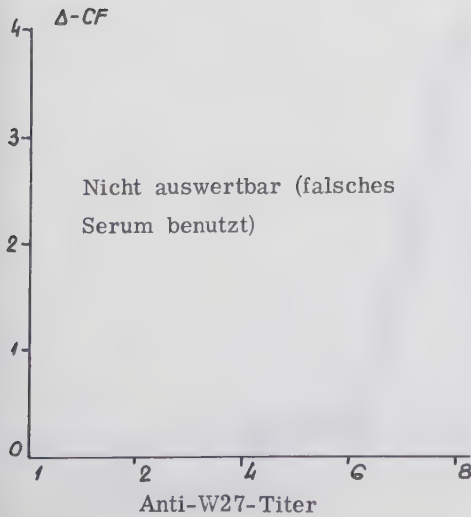
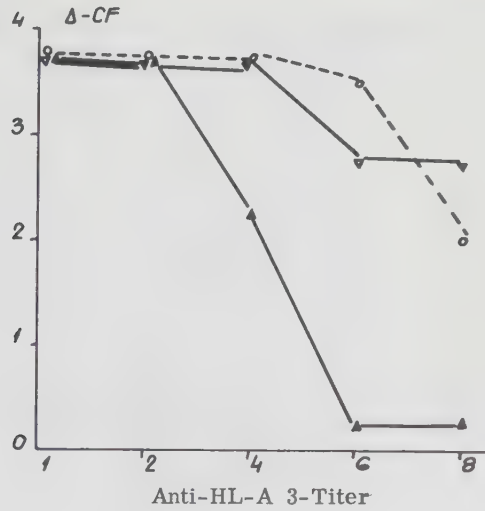
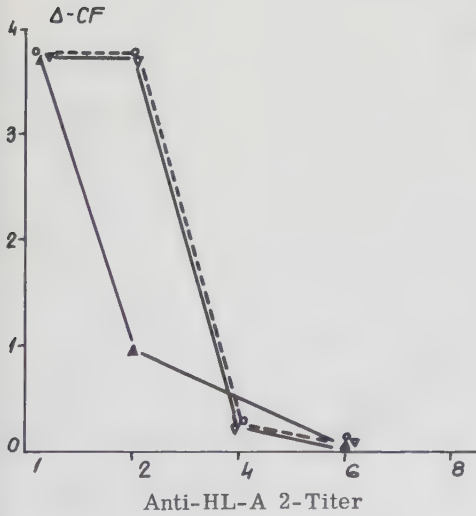
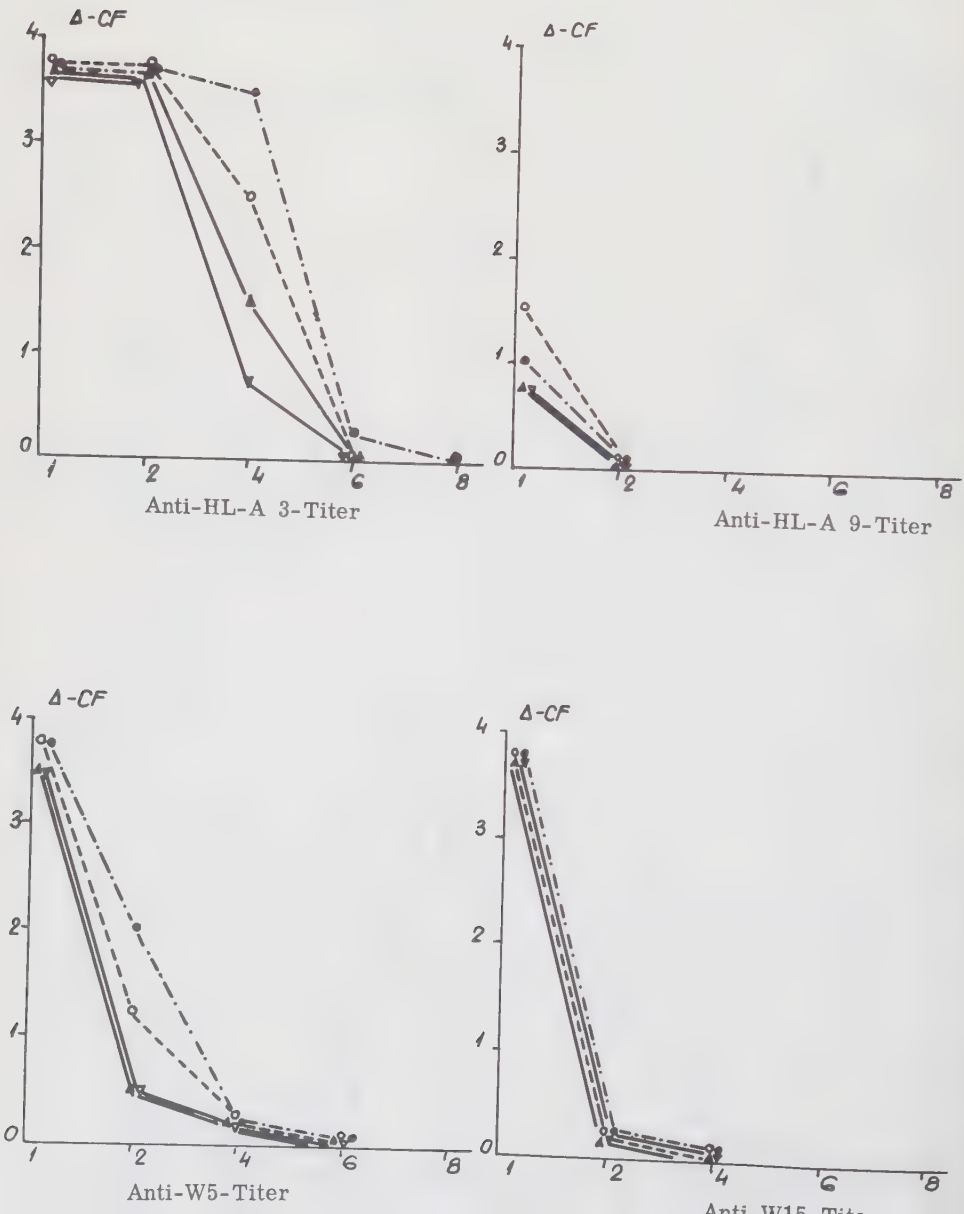


Abb. 16. Einfluß enzymatischer Behandlung auf die HL-A-Antigene der Plättchen des Spenders Nagel (3,9/W5,W15)

(o in Giessen verbliebene Stammsuspension, ● unspezifische Behandlung, ▲ Neuraminidasebehandlung, ▽ Pronasebehandlung)



lung keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrolle. Die mit Subtilisin behandelten Antigene HL-A 1 und HL-A 2 dieser Plättchensuspension waren jedoch schwächer darstellbar als auf dem Kontrollplättchen. Die Antigene HL-A 5 und HL-A 8 hingegen waren nach Behandlung mit Subtilisin nicht meßbar verändert (Abb. 17). Bei Vergleich der nach Köln geschickten, aber nicht enzymatisch behandelten Zellen mit den im Labor, im Kühlschrank, verbliebenen Zellen, zeigte sich fast immer eine entsprechende Antigenabschwächung der dem "Reisestress" unterzogenen Zellen.

Die enzymatische Behandlung der Plättchen des Spenders Seibert (2,3/7, Gi1) mit Bromelin, Thermolysin, Papain und Brinase ergab bis auf HL-A 2 keine signifikanten Unterschiede im Antigentiter der behandelten Zellen gegenüber der Kontrolle. Der Titer von HL-A 2 war bei sämtlichen behandelten Plättchen abgeschwächt (Abb. 18). Chymotrypsin, Trypsin und Pilz Proteinase bewirkten bei den Plättchen (II) des Spenders Drebert (1,9/SL, Gi1) eine deutliche Abschwächung sämtlicher Antigene gegenüber den Kontrollplättchen. HL-A 1 und HL-A 9 der mit Ficin behandelten Plättchen waren gegenüber den Kontrollzellen abgeschwächt, während die Antigene SL und Gi1 keinen Unterschied zeigten (Abb. 19).

Abb. 17. Einfluß enzymatischer Behandlung auf die HL-A-Antigene der Plättchen des Spenders Queckbörner (1,2/5,8)

(o in Giessen verbliebene Stammsuspension, ● unspezifische Behandlung, ▲ Neuraminidasebehandlung, □ Subtilisinbehandlung)

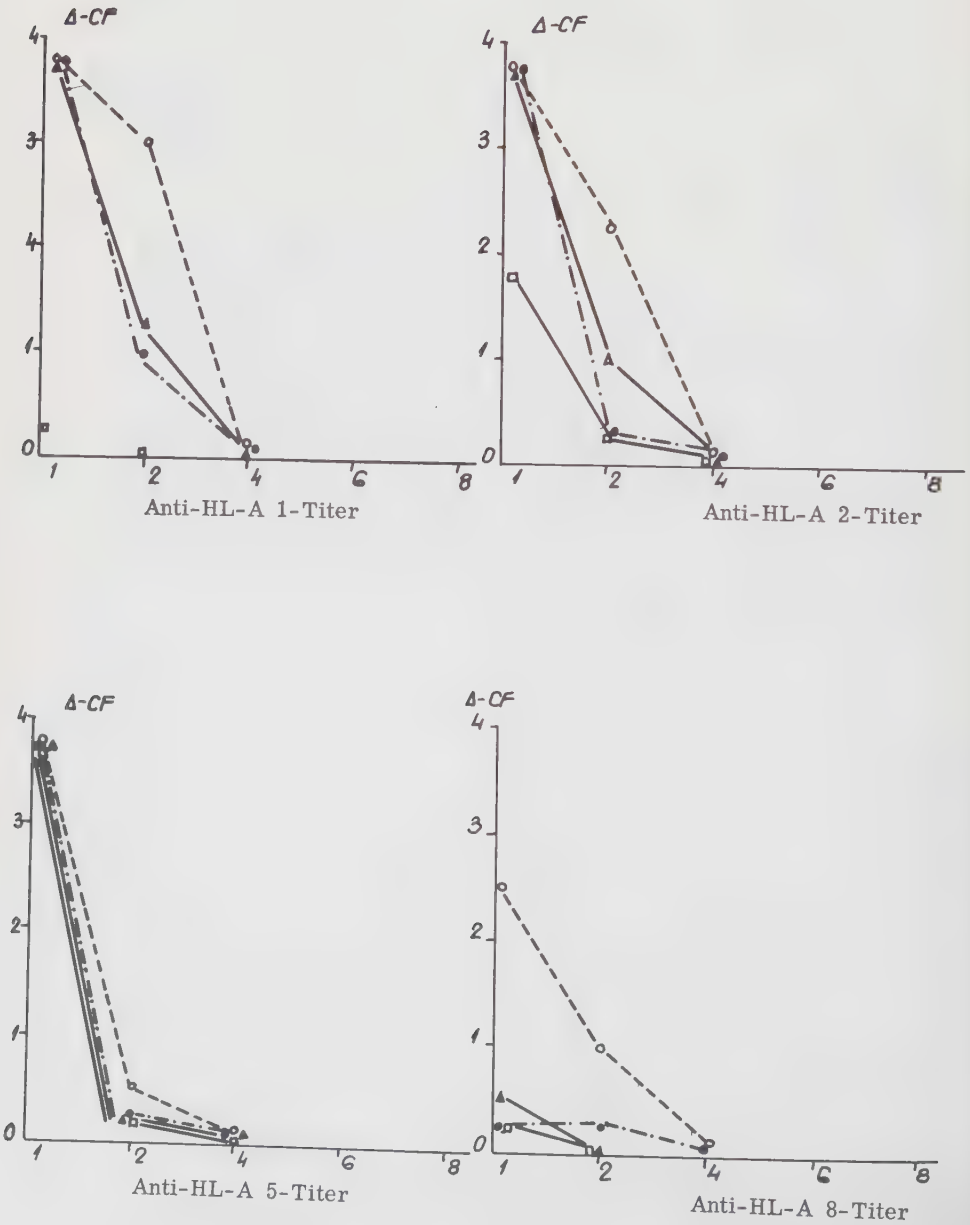


Abb. 18. Einfluß enzymatischer Behandlung auf die HL-A-Antigene der Plättchen des Spenders Seibert (2, 3/7, Gi1)

(● unpezifische Behandlung, △ Bromelin, □ Thermolysin, ▲ Papain, ■ Brinase)

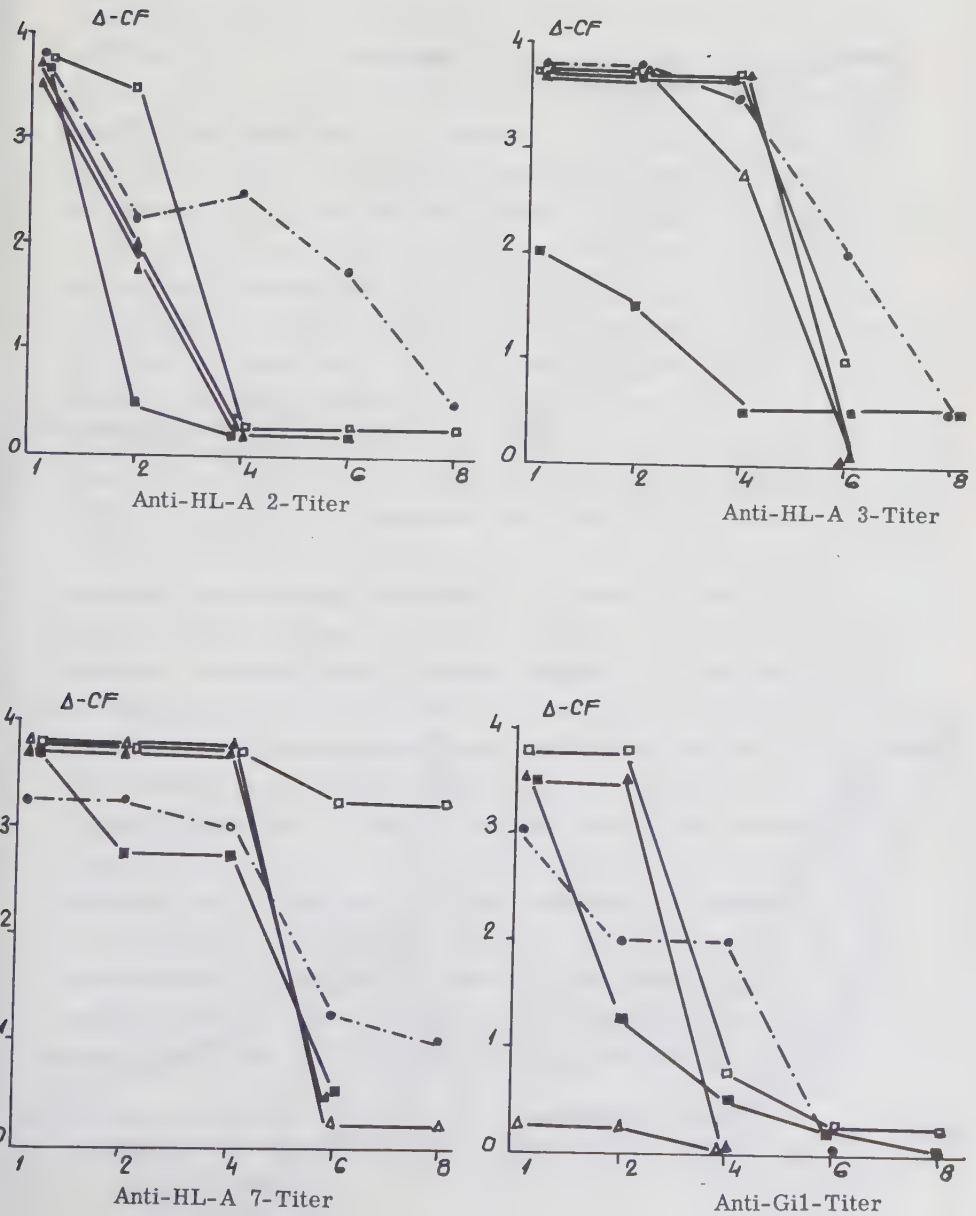
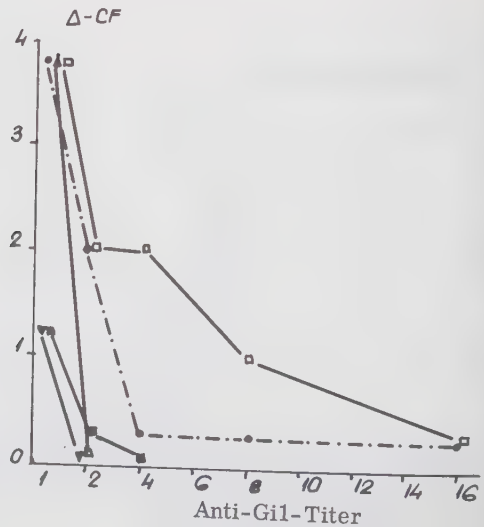
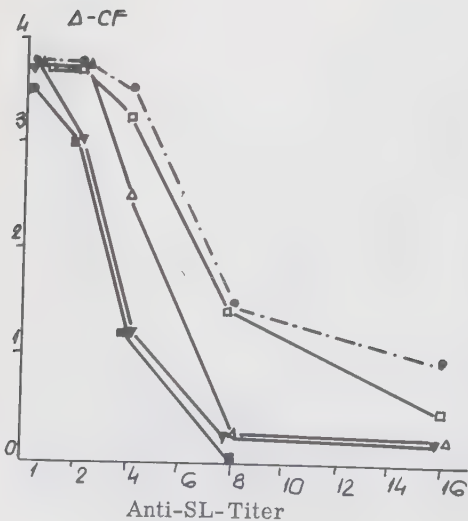
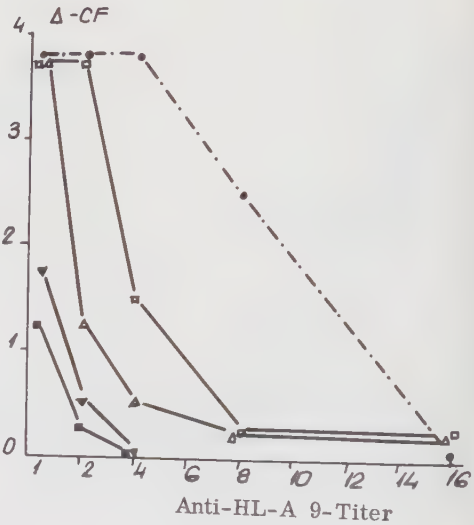
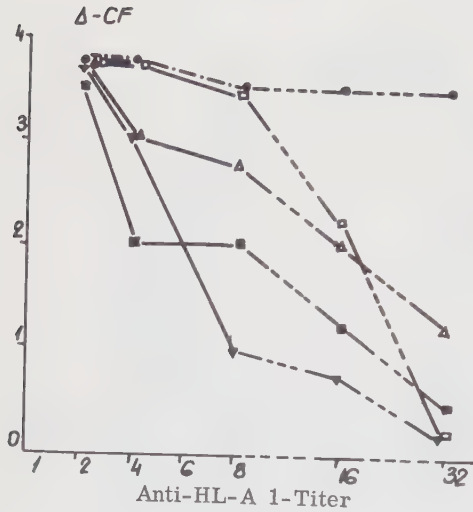


Abb. 19. Einfluß enzymatischer Behandlung auf die HL-A-Antigene der Plättchen (II) des Spenders Drebert (1,9/SL, Gi1)

(● unspezifische Behandlung, Δ Chymotrypsin, ∇ Trypsin, $\square$ Ficin, $\blacksquare$ Pilz-Proteinase)



D. DISKUSSION

Das HL-A-System (Human Leukocyte, System A) gehört neben dem ABO-System zu den wichtigsten Transplantations-Antigensystemen des Menschen.

Dausset (10) definierte 1958 das erste HL-A-spezifische Isoantigen MAC (HL-A 2). In relativ kurzem Zeitraum wurden weitere HL-A-Antigene auf Leukozyten und Thrombozyten beschrieben (Übersicht bei 22). Eine wesentliche Voraussetzung hierfür war die Einführung der Mikro-Lymphozytotoxizitätsreaktion durch Walford et al. (47) und Terasaki & Mc.Clelland (43). Shulman (33, 34) beschrieb den ersten C'-fixierenden HL-A-spezifischen antithrombozytären Antikörper und das entsprechende Antigen PlGrLy^{B1} (HL-A 2). In den letzten Jahren wurden weitere HL-A-Antigene auf Thrombozyten vornehmlich durch Svejgaard et al. und Colombani et al. (bei 40 zitiert) identifiziert, so daß heute fast alle bekannten HL-A-Antigene auch mit Hilfe der Plättchen-C'-Fixation definiert werden können.

Historisch war der Weg der Definition neuer HL-A-Antigene stürmisch, aber nicht ohne Schwierigkeiten. 1965 wurden auf einem Workshop in Leyden zum ersten Mal HL-A-spezifische Antikörper mehrerer Arbeitsgruppen miteinander verglichen. Es stellte sich hierbei heraus, daß kein Antiserum mit einem anderen vollkommen identische Reaktionen ergab. Auf dem Workshop in Turin 1967 wurde die Hypothese aufgestellt, daß die HL-A-Antigene von eng benachbarten Stellen eines Chromosomenpaares bestimmt werden und sich in zwei Subloci, dem 1. Sublocus oder LA-Locus und 2. Sublocus oder 4-Locus, gruppieren. 3 Antigene des LA-Locus wurden bereits definiert: HL-A 1, HL-A 2 und HL-A 3. Bis zum 4. Internationalen Workshop 1970 einigte man sich über 4 weitere HL-A-Antigene: HL-A 9 auf dem LA-Locus und HL-A 5, HL-A 7 und HL-A 8 auf dem 4-Locus (51). Auf dem 4. Internationalen Workshop 1970 in Los Angeles wurden von dem WHO-Nomenklaturkommittee noch 4 HL-A-Antigene anerkannt: HL-A 10, HL-A 11, HL-A 12 und HL-A 13.

Alle übrigen Antigene erhielten vorläufige W-Nummern, um die Verständigung zwischen den verschiedenen Arbeitsgruppen zu erleichtern.

Die Methode der Komplementbindungsreaktion wurde erstmalig in die Thrombozyten-Immunologie 1951 von Ackroyd (1,2) eingeführt. Shulman et al. (31,32,35) erweiterten die Methode durch Einführung der quantitativen C'-Fixation zur Bestimmung der Plättchen-Antigene. Aster et al. (3) vereinfachten die Plättchen-KBR durch Einführung einer Semi-Mikro-Methode. Modifikationen dieser Technik wurden später von Colombani (5) und Svejgaard (39) vorgestellt.

Entsprechend der methodischen Entwicklung der Plättchen-KBR wurden zunächst, mit Hilfe der Makro-Methode, HL-A-Antigene auf Plättchen typisiert (5,40,22). Der große Materialaufwand war jedoch ein großer Nachteil bei der HL-A-Typisierung von Plättchen bzw. der Spezifitätsbestimmung von Seren oder Eluaten. Erst die Einführung einer Mikromethode der Plättchen-C'-Bindungsreaktion (6,8,18,37,9,29) ermöglichte eine Anwendung dieser Technik im größeren Rahmen, vornehmlich in der Transplantationsserologie. Eine standardisierte Mikromethode zur Durchführung der Plättchen-KBR wurde auf dem 3. Internationalen Kongress der "Transplantation Society" vorgestellt (7). Inzwischen ist die Plättchen-MKBR neben der MLTox die in der Transplantationsserologie am weitesten verbreitete Methode. Eine Reihe von Vorteilen kennzeichnen die MKBR mit Plättchen gegenüber der Methode der MLTox. Die lange Haltbarkeit der Thrombozytensuspensionen bei 4⁰ C ermöglicht den Einsatz eines ständig vorhandenen Zellpanels für Reihenuntersuchungen von Seren wie für Absorptionszwecke. Der Transport der Plättchen über weite Entfernungen ermöglicht den Austausch von Zellen und damit eine Standardisierung der Zellpanel. Ferner besteht die Möglichkeit der quantitativen Bestimmung von Antigenen mit Hilfe der MKBR (40). Die Reaktionsergebnisse werden makroskopisch beurteilt und sind einer eventuellen Automatisierung zugänglich.

Der Hauptnachteil der MKBR gegenüber der MLTox ist die geringere Empfindlichkeit der Plättchen-MKBR. Sie wird mit ca. 1/20 der Empfindlichkeit der MLTox angegeben (42, 6). Dies bedingt einerseits eine größere Monospezifität der gefundenen Antiseren in der MKBR, andererseits sind genügend starke, C'-fixierende Seren schwerer auffindbar.

HL-A-spezifische, antithrombozytäre Antikörper werden durch häufige Bluttransfusionen, durch Transplantation von Haut bzw. eines anderen Organs oder während der Schwangerschaft durch Übertritt von HL-A-inkompatiblen Plättchen bzw. Leukozyten vom Kind in den mütterlichen Organismus induziert.

Die Häufigkeit C'-fixierender Plättchen-Antikörper bei Schwangeren wird in der Literatur zwischen 1,0 und 2,6 % angegeben (Übersicht bei 40). Thierfelder und Pfisterer (44) fanden bei 1 % von 1000 Schwangeren C'-fixierende antithrombozytäre Antikörper. Eine Untersuchung von Ahrons et al. (bei 40 zitiert) an Multipara, die sämtliche Transfusionen erhalten hatten, ergab in 5 % der Fälle C'-fixierende Antikörper gegen Plättchen. Mueller-Eckhardt et al. (28) fanden mit Hilfe der Plättchen-MKBR bei 500 schwangeren Frauen in 3,6 % der Fälle C'-fixierende Antikörper.

Die in der Literatur angegebenen Frequenzen C'-fixierender antithrombozytärer Antikörper bei polytransfunden Patienten liegen höher, meist infolge einer kombinierten Antikörperstimulation durch Schwangerschaft und gehäuften Transfusionen. So fanden Aster et al. (3) und Dausset et al. (12) in ungefähr 9 % der Fälle C'-fixierende antithrombozytäre Antikörper bei polytransfunden Patienten.

Thrombozytenagglutinine wurden bei polytransfunden Patienten von verschiedenen Arbeitsgruppen mit einer Häufigkeit zwischen 0 und 12,3 % gefunden (Übersicht bei 40).

Shulman et al. (36) fanden in 22 % C'-fixierende Antikörper bei polytransfunden Patienten und beschrieben bereits die Korrelation der Antikörperfrequenz mit der Anzahl der erhaltenen Transfusionen.

Mit zunehmender Anzahl der transfundierten Konserven stieg die Antikörperhäufigkeit in den Seren polytransfundierter Patienten von 5 auf 36 %. Dausset et al. (11) fanden Leukozytenagglutinine in 7 % nach 1 - 3 und in 50 - 60 % der Fälle nach mehr als 50 vorausgegangenen Transfusionen. Engelfriet et al. (16) beobachteten einen Anstieg der Häufigkeit cytotoxischer, antileukozytärer Antikörper von 50 %, bei Patienten, die unter 5 Transfusionen erhalten hatten, bis auf 89 % nach mehr als 20 vorausgegangenen Transfusionen. Payne et al. (bei 27 zitiert) fanden antileukozytäre und antithrombozytäre C'-fixierende Isoantikörper bei polytransfundierten Patienten mit einer Häufigkeit von 5 - 60 %, je nach Anzahl der vorausgegangenen Transfusionen (10 - 50 Konserven).

Wir fanden bei der Untersuchung von ca. 700 Seren von 339 verschiedenen polytransfundierten Patienten in 5,01 % der Fälle HL-A-spezifische Antikörper und konnten auch einen Anstieg der Häufigkeit dieser Antikörper (2,5 - 50 %) mit steigender Anzahl der transfundierten Konserven finden (vergleiche Abb. 3).

Außer HL-A-spezifischen C'-fixierenden Seren fanden wir in den untersuchten Seren polytransfundierter Patienten der Blutgruppe 0 und B, in einem relativ hohen Prozentsatz, Anti-A- und Anti-AB-Hämolysine (vgl. Abb. 4).

Die Anwesenheit der Blutgruppenantigene A und B auf Thrombozyten ist von vielen Autoren mit Hilfe verschiedener Methoden wie Absorptionsuntersuchungen, der Thrombozytenagglutination, der Mischzellagglutination, der Plättchenüberlebenszeitbestimmung sowie der C'-Fixation bestätigt worden (Übersicht bei 40). Die bei Individuen der Blutgruppe 0 natürlicherweise vorkommenden, gegen die Antigene A und B gerichteten, Isoagglutinine gehören der Immunglobulinklasse IgM an, fixieren kein Komplement und sind demnach in der Plättchen-MKBR nicht nachweisbar. Dasselbe gilt für Anti-A-Agglutinine bei Individuen der Blutgruppe B und Anti-B-Agglutinine bei Blutgruppe A.

C'-fixierende Plättchen-Isoantikörper konnten bisher bei nicht vor-immunisierten Personen nicht nachgewiesen werden (Übersicht bei 40).

Die von uns gefundenen Anti-A und Anti-B-Hämolsine bei polytrans-fundierten Patienten der Blutgruppe 0 und B müssen demnach Folge einer Vorimmunisierung gegen die Isoantigene A und B sein. Eine derartige Immunisierung kann durch Sensibilisierung mit Bakterien-antigenen auftreten, die neben einer Produktion von Isoagglutininen auch die Bildung von Hämolsinen bewirken.

Die Untersuchung der Seren von 339 polytransfunden Patienten er-gab, mit Hilfe der Plättchen-MKBR, 4 monospezifische und 13 polyspe-zifische HL-A-Antiseren.

Über die Häufigkeit der Immunisierung gegen HL-A-Antigene bei mul-tiplen Transfusionen läßt sich wegen des relativ kleinen Materials keine Aussage machen. Zu bemerken wäre nur, daß Anti-HL-A 5 in zwei der gefundenen Antiseren vorhanden war, obwohl die Genfre-quenz dieses Antigens in der Bevölkerung relativ niedrig ist. Dies bestätigt den Befund von Mueller-Eckhardt et al. (28), daß HL-A 5 zu den Antigenen mit starker Antigenität gehört. Die Identifizierung des Antikörpers Anti-Gi 2 zeigt die Notwendigkeit der Aufnahme von nicht vollständig typisierten Plättchen ins Zellpanel.

Wie aus Tab. 4 ersichtlich, ergab die Auswertung der 4 in der Such-reaktion "monospezifischen" Seren eine hochsignifikante Übereinstim-mung mit den Typisierungsergebnissen der Testplättchen ($p < 0,001$). Auch wenn dadurch die Spezifität weitgehend gesichert ist, erlaubt dies noch keine Aussage über die "wahre" Monospezifität der Anti-seren. Wegen der relativ geringen Empfindlichkeit der MKBR kann mit empfindlicheren Methoden, wie die MLTox, gezeigt werden, daß Seren in der Regel polyspezifischer sind als sie in der MKBR den Anschein haben (28). Die geringe Sensibilität der MKBR erweist sich aber bei polytransfunden Patienten, die multipel gegen HL-A-Antigene sensibilisiert sind, auch als Vorteil, denn im Gegensatz zur

MLTox werden nur die stärkeren Antikörper erfaßt, was wenigstens einen Hinweis für einen Teil der Antikörperspezifität ermöglicht (22). Mit Hilfe der Plättchen-MKBR konnte deshalb die Antikörperspezifität bei 9 der 17 positiven HL-A-spezifischen Seren schon nach den Ergebnissen der Suchreaktion geklärt werden (Tab. 4).

Die endgültige Spezifitätsbestimmung von HL-A-spezifischen Antiseren kann nur durch Absorptions- bzw. Elutionsuntersuchungen erfolgen. Absorptionsuntersuchungen sind als Methoden zur Spezifitätssicherung von HL-A-spezifischen Seren relativ verbreitet, seitdem sie als ein Kriterium der Monospezifität von Walford et al. (48) empfohlen wurden. Nach Walford kann man von einer "operational monospecificity" eines Antiserums sprechen, wenn 30 Absorptionen keinen Anhalt für das Vorliegen weiterer Spezifitäten im untersuchten Serum ergeben. Dieses Vorgehen hat das WHO-Nomenklaturkommittee 1968 bei der Definition monospezifischer HL-A-Antiseren übernommen (51).

Wegen der im HL-A-System häufig beobachteten Kreuzreaktionen von Antikörpern haben Absorptionsuntersuchungen jedoch ihre Bedeutung bei der Definition der Monospezifität eines Antiserums eingebüßt (22). Die Spezifitätsbestimmung eines Antiserums allein durch Absorptionsuntersuchungen setzt einen ausreichend hohen Titer des Antiserums voraus; ein Kriterium, welches nur wenige C'-fixierende HL-A-spezifische Seren erfüllen.

Durch Elution der an Thrombozyten absorbierten Antikörper ist eine Anreicherung der Antikörperaktivität und damit eine genauere Spezifitätsabklärung C'-fixierender, HL-A-spezifischer Seren möglich. Shulman et al. (35) empfahlen 1964 die Säureelution als Methode der Wahl zur Spezifitätsbestimmung antithrombozytärer Antikörper. Die Brauchbarkeit dieser Methode wurde inzwischen von Colombani et al. (zitiert bei 40) für HL-A-spezifische, C'-fixierende Antiseren bestätigt. Die Brauchbarkeit dieses Verfahrens zur Sicherung der Spezifitäten von HL-A-Antikörpern, zur Herstellung von monospezifischen HL-A-Antiseren für die Typisierung von Plättchen in der

MKBR und zum Nachweis kreuzreagierender Antikörper des HL-A-Systems, wurde auch von Heinrich und Mueller-Eckhardt (19) an Schwangerenserum demonstriert. Eigene Untersuchungen bestätigen diese Erfahrung.

Die von uns durchgeführten methodischen Untersuchungen der Absorption und Elution HL-A-spezifischer Antikörper an Thrombozyten wurden mit einem Anti-HL-A 2-Serum (Titer 1:2) durchgeführt. Geht man von einer dreimaligen Absorption von 0,5 ml Serum bei 37° C aus und untersucht den Antikörpertiter des Eluates in Abhängigkeit von der Menge der benutzten Plättchen, dann sind 1×10^9 Plättchen ungenügend. Die Steigerung der Plättchenzahl auf 3×10^9 Plättchen bringt eine optimale Antikörperausbeute im Eluat, die mit 6×10^9 Plättchen nicht wesentlich erhöht werden kann (vgl. Tab. 7). Eine dreimalige Beladung der Plättchen mit 0,5 ml Antiserum bringt gegenüber der einmaligen Absorption mit 1,5 ml Serum keine wesentliche Verbesserung der Antikörperausbeute im Eluat (vgl. Abb. 8 und 10). Die während der Absorption eingestellte Temperatur spielt offensichtlich keine entscheidende Rolle (vgl. Abb. 9). Die Absorption über Nacht bei verschiedenen Temperaturen zeigte, daß die von Shulman et al. (35) vorgeschlagene Absorption bei 4° C die beste Antikörperausbeute ergab (vgl. Abb. 10). Annähernd gleich gute Ergebnisse wurden jedoch auch bei Zimmertemperatur erreicht, so daß sich dieser Temperaturbereich aus praktischen Gründen bei der Absorption anbietet. Die Untersuchung der Abhängigkeit der Antikörperkonzentration im Eluat von der Inkubationszeit während der Absorption (Abb. 11) bestätigte die Beobachtung von Shulman et al. (35), daß die Antigen - Antikörper - Bindung weitgehend in den ersten 10 - 15 min. erfolgt.

Aufgrund dieser methodischen Untersuchungen der Absorption eines Anti-HL-A 2-Antiserums an Plättchen haben wir die Absorption und Elution HL-A-spezifischer Seren mit Plättchen wie folgt standardisiert: zweimalige Absorption des Antiserums mit 3×10^9 Plättchen

bei 20° C, wobei die erste Absorption eine Stunde dauert und die zweite Absorption über Nacht läuft.

Die Untersuchung der Antikörperausbeute im Eluat in Abhängigkeit vom pH ergab, daß HL-A-spezifische Antikörper ein ähnliches Verhalten aufweisen wie plättchenspezifische Isoantikörper, z. B. Anti-PLA 1 (32). Der optimale pH bei der Säureelution von Anti-HL-A 2 liegt zwischen 3,0 - 3,5 und ist mit dem von Shulman et al. gefundenen optimalen pH für die Elution von Anti-PLA 1 (3,0 - 3,4) identisch. Die Senkung des pH unter 3,0 führt zu einer geringeren Antikörperaktivität im Eluat, da IgG-Immunglobuline in diesem pH-Bereich sehr schnell inaktiviert werden (32). Das gleiche geschieht, wenn bei der anschließenden Neutralisation überschießend NaOH zugegeben wird und der pH vorübergehend (10 min) bei 10,0 oder 8,0 eingestellt ist. Im Gegensatz zu Shulman et al. (32) aber, die bei pH-Werten über 3,4 keine Antikörperaktivität (Anti-PLA 1) im Eluat erzielen, konnten wir zeigen, daß Anti-HL-A 2 auch über pH 3,5 eluiert werden kann, die Antikörperausbeute im Eluat jedoch deutlich zurückgeht. Elutionsverfahren, die für erythrozytäre Antikörper verwendet werden, wie die Wärme- bzw. Ätherelution, erwiesen sich für die Elution von HL-A-spezifischen Antikörpern von Thrombozyten als unbrauchbar. Dies entspricht wiederum Erfahrungen von Shulman et al. (32, 35) mit plättchenspezifischen Antikörpern.

Eingehende Absorptions- und Elutionsuntersuchungen mit Thrombozyten wurden an 6 HL-A-spezifischen Seren polytransfundierter Patienten durchgeführt. Aus den, nach den Ergebnissen der Suchreaktion polyspezifischen, Seren ließen sich auf diese Weise "monospezifische" Eluate isolieren, sowie weitere Antikörperspezifitäten erkennen. Die Ergebnisse des Serums P 43 dienen hierfür als Beispiel. Das Originalserum P 43 imponierte als Anti-W10-Serum, nach Absorption und Elution konnten weitere Antikörperspezifitäten gegen die Antigene W27 und HL-A 12 isoliert werden (vgl. Tab. 5b und 5c). Das Beispiel zeigt, daß die Isolierung "monospezifischer" Eluate aus

polyspezifischen Antiseren, mittels Absorption und Elution, eng verbunden ist mit dem Problem der Kreuzreaktionen im HL-A-System.

Die Möglichkeit der Kreuzreaktionen im HL-A-System wurde zuerst von Ceppellini et al. (4) angedeutet und später von Svejgaard & Kissmeyer-Nielsen (38) und Dausset et al. (13), unabhängig voneinander, am Beispiel des kreuzreagierenden Antikörpers Anti-HL-A 2 + Ba* (W28) demonstriert. Inzwischen weiß man, daß die Bildung kreuzreagierender Antikörper im HL-A-System sehr ausgeprägt ist. Kreuzreaktionen werden jedoch immer nur innerhalb eines HL-A-Locus beobachtet, niemals zwischen Antigenen des 1. und 2. Locus (22,40). Die zuerst von Thorsby et al. (45) beschriebene Kreuzreaktion zwischen HL-A 3 und HL-A 1 konnten wir im Falle des Serums P 50 beobachten (vgl. Tab. 4 und 5b). Eine relativ häufig beobachtete Kreuzreaktion zwischen Anti-HL-A 7 und W27 fanden wir im Serum P41 bestätigt (vgl. Tab. 5a). Weitere Kreuzreaktionen zwischen HL-A 7 und W10 (P 42) und HL-A 5 + 12 + SL (P 54) konnten nach den Ergebnissen der Absorptions- und Elutionsuntersuchungen von Seren polytransfundierter Patienten gezeigt werden (vgl. Tab. 5b und 5c). In drei Fällen waren Kreuzreaktionen nur dadurch angedeutet, daß Plättchen Antikörperspezifitäten absorbierten, ohne die entsprechenden Antigene zu besitzen (bei Serum P54, P41 und P53). In der Literatur (40) werden solche Zellen, die spezifische Antikörper absorbieren, ohne das entsprechende Antigen zu besitzen, "reaction-negative-absorption-positive" genannt, in Analogie zu dem als ANAP (agglutination-negative, absorption-positive) und CYNAP (cytotoxicity-negative, absorption-positive) (bei 40 zitiert) bezeichnetem Phänomen. Der größte Teil dieser Reaktionen kann durch kreuzreagierende Antikörper erklärt werden.

Die Antikörperspezifität kreuzreagierender Eluate hängt allerdings auch von der zur Absorption verbrauchten Serummenge ab. Die Absorption mit wenig Serum bzw. die nachträgliche Verdünnung des Eluates kann so zur Gewinnung von "monospezifischen" Eluaten füh-

ren. Umgekehrt läßt sich für viele monospezifische Eluate postulieren, daß sich ihre Antikörperspezifität verbreitert, wenn die Antikörperaktivität konzentriert wird. Durch Konzentration des Antikörpers im Eluat lassen sich auch starke Eluate gegen seltene HL-A-Antigene isolieren, die für die HL-A-Typisierung von Plättchen in der MKBR geeignet sind. Dieses Vorgehen ermöglicht wahrscheinlich die Herstellung C'-fixierender Antiseren gegen alle HL-A-Antigene, sofern in den entsprechenden Seren überhaupt die jeweilige Antikörperspezifität vorhanden ist.

Heinrich und Mueller-Eckhardt (21) zeigten an 400 unausgewählten Schwangerenserum die Effizienz von Absorptions- und Elutionsuntersuchungen mit Thrombozyten zum Zwecke der Herstellung geeigneter Typisierungseluate für die Plättchen-MKBR. Wir haben mit derartigen Eluat 423 unverwandte Blutspender der Gießener Blutbank mit Hilfe der Plättchen-MKBR typisiert und konnten die Brauchbarkeit dieses Verfahrens zur Gewinnung von Testreagenzien für die Plättchen-MKBR bestätigen. Durch eine relativ einfache und schnelle Herstellung von 163 Typisierungseluat aus 26 Schwangeren- und 19 Polytransfunden-Seren waren wir in der Lage, 20 HL-A-Antigene auf Plättchen zu bestimmen. Die Herstellung geeigneter Antiseren gegen die Antigene W22, HL-A 8 und HL-A 12 bereitete jedoch Schwierigkeiten. Ein spezifisches HL-A 10-Antiserum konnten wir nicht finden.

Die Typisierung von 423 Plättchensuspensionen unverwandter Blutspender mit Hilfe solcher Typisierungseluate zeigte, daß die Ergebnisse von 153 Eluat mit entsprechend parallel durchgeführten Typisierungsergebnissen in der MLTox hochsignifikant übereinstimmen ($p < 0,001$).

Bei 14 der in beiden Mikromethoden bestimmten 20 HL-A-Antigenen war die Übereinstimmung der Typisierungsergebnisse größer als 98 % (HL-A 1, 2, 9, 11, Gi2, -HL-A 5, 7, 13, W5, W10, W14, W15, W 22, W27). Die Antigene HL-A 3 und W28 wurden in der

MKBR zuverlässiger bestimmt als in der parallel durchgeführten MLTox. Dies führen wir auf die häufig beobachtete Kreuzreaktion von HL-A 3 mit HL-A 1 und HL-A 11 einerseits bzw. W28 und HL-A 2 andererseits zurück. Unterschiede in der Bestimmung der Antigene HL-A 8, HL-A 12, SL? und Gi1 in beiden Mikromethoden beruhen auf der Heterogenität dieser Antigene. HL-A 8 wird mit C'-fixierenden Antiseren schlecht erfaßt. Entsprechende Versuche, Anti-HL-A 8 in Eluat anzureichern, sind uns nicht gelungen. Die nach den Typisierungsergebnissen in der Plättchen-MKBR berechneten Genfrequenzen ergaben bei 12 der 20 bestimmten HL-A-Antigene Ergebnisse, die im Bereich der von anderen europäischen Arbeitsgruppen ermittelten Werte liegen (14, 42, 41, 24, 26, 17). Dies betrifft die Antigene HL-A 1, 2, 3, 5, 7, 8, 13, W5, W10, W14, W15, W27. Genfrequenzberechnungen von weiteren 5 Antigenen (HL-A 9, HL-A 11, W28, W 22 und SL?) zeigten nur geringe Abweichung von den in der Literatur beschriebenen Frequenzen. Größere Unterschiede in den Genfrequenzen ergaben sich in unserem Blutspenderkollektiv bei 3 HL-A-Antigenen (Gi2, HL-A 12 und Gi1). Die größte Diskordanz (11,40 %) zwischen den in beiden Mikromethoden ermittelten Genfrequenzen eines HL-A-Antigens betraf HL-A 12, dessen, in der MKBR ermittelte Genfrequenz deutlich unter der von anderen Autoren mitgeteilten Genfrequenz lag. Wir glauben, daß das in der Plättchen-MKBR ermittelte Antigen einen Teilabschnitt von HL-A 12 definiert, so daß wir Hinweise für eine mögliche Unterteilung von HL-A 12 haben. Die Abweichungen beider Mikromethoden bezüglich der Typisierung des Antigens SL ist durch die Heterogenität des Antigenkomplexes "SL" zu erklären, von dem man weiß, daß es mindestens in drei Unterabschnitte aufgespalten werden kann (46).

Die Antigene Gi1 und Gi2 wurden mit eigenen Seren definiert. Nachträgliche vergleichende Untersuchungen mit Dr. Colombani, Paris, ergaben eine völlige Identität dieser Antigene mit CM bzw. Ao28. Die Typisierungsergebnisse in der MKBR und MLTox zeigten be-

züglich Gi1 eine Diskordanz von 8,92 %. Außerdem lag die in der Plättchen-MKBR ermittelte Genfrequenz von Gi1 (0,038) deutlich niedriger als die von Dausset (14) mitgeteilte Genfrequenz von CM (0,091). Geeignete C'-fixierende Testreagenzien zur Bestimmung von Gi1 ließen sich schwer herstellen, da die wenigen Eluate eine leichte unspezifische C'-Fixation aufzeigten. Obwohl eine Übereinstimmung der Antigene Gi2 mit Ao 28 festgestellt wurde, ergab die Berechnung der Genfrequenz von Gi2 in unserem Blutspenderkollektiv mit 0,039 eine geringere Häufigkeit als Dausset (14) für Ao 28 angegeben hat (0,083). Dies ist wahrscheinlich Ausdruck der unterschiedlichen Verteilung des Antigens in der Pariser bzw. Gießener Bevölkerung.

Der Prozentsatz der noch nicht typisierten Gene des 1. bzw. 2. HL-A-Locus wurde in unserem Material mit 0,182 (X_1) und 0,220 (X_2) angegeben (vgl. Tab. 6). Während die Frequenz von X_1 mit den Berechnungen von Dausset (14) übereinstimmt, ist die Frequenz der mit Hilfe der MKBR nicht identifizierten Gene auf dem 2. Locus mit 0,220 relativ hoch. Dies ist jedoch sicherlich eine Frage der Zuverlässigkeit der Typisierung. Je mehr unbekannte Kreuzreaktionen die verwendeten Antiseren aufweisen, umso höher wird die Genfrequenz der typisierten Antigene und dementsprechend geringer die Frequenz unbekannter Antigene. Die Tatsache, daß die meisten Genfrequenzberechnungen an der unteren Grenze der in der Literatur angegebenen Genhäufigkeiten liegen, spricht eher dafür, daß die hohe Frequenz unbekannter Antigene auf dem 2. Locus durch eine besonders exakte Typisierung der übrigen Antigene bedingt ist. Insgesamt wurden, mit Hilfe der Plättchen-MKBR, 29,8 % der 423 Blutspender vollständig ("fullhouse") typisiert (vgl. Tab. 7).

Die guten Erfolge, die in den letzten Jahren in der Bestimmung der HL-A-Antigene erzielt worden sind, bedingen gleichzeitig eine immer kompliziertere Unterteilung des HL-A-Systems. Demzufolge wird sich die Transplantationsserologie immer größeren Problemen gegenübergestellt sehen, da die Möglichkeit, einen idealen "match"

zwischen Spender und Empfänger zu bekommen, immer unwahrscheinlicher wird. Ein Ausweg aus dieser Situation wäre die Möglichkeit der Induktion einer Toleranz mit löslichen Antigenen. Voraussetzung dafür ist die genaue Kenntnis der physikalischen und chemischen Eigenschaften der HL-A-Antigene.

Untersuchungen auf diesem Gebiet sind in der letzten Zeit intensiviert worden. Es konnten bereits HL-A-Antigene von Lymphozyten (15,23) durch Autolyse oder Papainandauung in Lösung gebracht und in einem Hemmversuch indirekt nachgewiesen werden. Mit Plättchen hat man die Möglichkeit, den Einfluß verschiedener Enzyme auf die Antigenität direkt nachzuweisen und erhält zusätzlich Aufschluß über die Integration der Antigene in die Zellmembran.

Der Einfluß verschiedener Enzyme auf HL-A-Antigene ist bereits von verschiedenen Autoren untersucht worden. Mann et al. (bei 49 zitiert) beschrieben den Verlust der Aktivität des löslichen Antigenmaterials unter Einfluß von Trypsin und Chymotrypsin, beobachteten jedoch keine Minderung der Antigenaktivität unter Einfluß von Neuraminidase. Shulman et al. (32) beobachteten, daß die Behandlung mit hohen Konzentrationen von Trypsin keine Inaktivierung des plättchenspezifischen Antigens PL A 1 bewirkte. Sie schlossen daraus, daß das Antigen in die stromale Fraktion der Plättchen integriert sei und wahrscheinlich einen Polysaccharidcharakter trägt.

In eigenen Experimenten untersuchten wir den Einfluß einer relativ kurzen enzymatischen Wirkung von Neuraminidase und 10 verschiedenen Proteasen auf HL-A-Antigene von Plättchen. Die ausgezeichnete Haltbarkeit der Thrombozytensuspensionen erlaubte den Transport der Zellen nach Köln zum Zwecke der Durchführung der enzymatischen Behandlung. Um den spezifischen enzymatischen Einfluß der Behandlung von dem unspezifischen Einfluß des Transportes, der Waschvorgänge etc. zu unterscheiden, wurden alle serologischen Ergebnisse mit einer Kontroll-Plättchensuspension verglichen, die den gleichen "Reisestress" bzw. alle Waschvorgänge durchlaufen

hatte, aber nicht enzymatisch behandelt wurde. Dies erwies sich als notwendig, nachdem gefunden wurde, daß in fast allen Fällen, die dem "Reisestress" unterzogenen Zellen eine Antigenabschwächung gegenüber den in Gießen, im Kühlschrank verbliebenen Plättchen zeigten.

Der Nachweis einer Antigenabschwächung wurde mit Hilfe der Bestimmung des Titer spezifischer, C'-fixierender Antiseren gegen HL-A-Antigene der enzymatisch behandelten Plättchen durchgeführt. Auf diese Weise zeigte sich, daß die Neuraminidasebehandlung bei allen untersuchten Plättchen keinerlei Änderung bzw. Abschwächung der HL-A-Antigene bewirkte. Die mit Pronase und Subtilisin erzielten Antigenabschwächungen einiger HL-A-Antigene der Plättchen der Spender Nagel bzw. Queckbörner erlauben, wegen der geringen Unterschiede gegenüber den Kontrollplättchen, keine sicheren Rückschlüsse auf den Einfluß dieser Enzyme. Das gleiche gilt für Bromelain, Thermolysin, Papain und Brinase, die nur eine Abschwächung des Antigens HL-A 2 bewirkten. Die Behandlung mit Chymotrypsin, Trypsin und Pilzproteinase führte zu einer Abschwächung sämtlicher HL-A-Antigene der untersuchten Plättchen. In keinem Fall kam es - wie ursprünglich erhofft - zu einem besseren Nachweis der HL-A-Antigene nach der enzymatischen Behandlung. Auf der anderen Seite kam es unter der Behandlung in keinem Fall zu einem völligen Aktivitätsverlust der HL-A-Antigene auf Plättchen. Es sind deshalb weitere Untersuchungen notwendig, um den Einfluß einer enzymatischen Behandlung auf HL-A-Antigene der Plättchen aufzuklären.

Die extreme Komplexität des HL-A-Systems, das damit verbundene Problem der kreuzreagierenden Antikörper und die große Heterogenität der HL-A-Antigene erschweren wesentlich die Anwendung dieses Antigensystems in der klinischen Transplantation. Im Moment steht man auf dem Standpunkt, daß neben dem ABO- und HL-A-System andere Antigensysteme (z. B. "MLC-Locus") die Erfolgsaussichten einer Transplantation bestimmen. Im Gebiet der Nieren- und

Knochenmarkstransplantation sind jedoch die Zukunftsaussichten einer routinemäßigen Anwendung der Kenntnisse über das HL-A-System gut. Die heutigen Erkenntnisse über nichthämolytische Transfusionsreaktionen und unser Wissen über die Wirksamkeit von Thrombozytentransfusionen erfordern in der Zukunft eine stärkere Berücksichtigung der HL-A-Antigene.

Die Erforschung der biologischen Bedeutung von Histokompatibilitätssystemen des Menschen und somit des HL-A-Systems wird ein wichtiges Arbeitsgebiet der Zukunft sein. Es scheint, daß Histokompatibilitätssysteme für die Integrität des menschlichen Organismus bzw. seiner Fähigkeit, zwischen körpereigen und körperfremd zu unterscheiden, unabdingbar sind (22). Fremdes antigenes Material muß erkannt und beseitigt werden können. Eng damit verbunden ist das Problem der Entstehung von Tumoren und Infektionen, bzw. deren Abwehr durch einen immunologisch aktiven Organismus. Verschiedene Untersuchungen über die Korrelation zwischen HL-A-System und Krankheiten wie lymphatische und myeloische Leukämie, cystische Pankreasfibrose, Retinoblastom etc. sind in der Zwischenzeit bekannt geworden. Die Pathogenität von Krankheitserregern könnte z. T. in der gegenüber den körpereigenen Merkmalen großen Ähnlichkeit von Antigenstrukturen der Erreger liegen.

Dies alles läßt uns hoffen, daß wir ein neues Verständnis der biologischen Funktion des HL-A-Systems gewinnen werden und gleichzeitig etwas über die immunbiologischen Mechanismen der Abwehr von entarteten Zellen bzw. Krankheitserregern lernen können.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die mit Hilfe der Mikro-Komplementbindungsreaktion (MKBR) bei ca. 700 Seren von 339 verschiedenen polytransfunden Patienten durchgeführte Reihenuntersuchung ergab in 5,01 % der Fälle das Vorliegen HL-A-spezifischer Antikörper. Die Wahrscheinlichkeit der Immunisierung durch multiple Bluttransfusionen korrelierte mit der Anzahl der erhaltenen Transfusionen. Bei polytransfunden Patienten der Blutgruppe 0 und B wurden zusätzlich, überraschend häufig, Anti-A- und Anti-AB-Hämolysine gefunden. Die Möglichkeit der Bildung dieser Immunantikörper wird diskutiert.

Eingehende Absorptions- und Elutionsuntersuchungen mit Thrombozyten an 6 HL-A-spezifischen Seren polytransfundierter Patienten sicherten die nach Ergebnissen der Reihenuntersuchung mit Hilfe der Plättchen-MKBR vermuteten Antikörperspezifitäten. Folgende Kreuzreaktionen innerhalb des HL-A-Systems wurden auf diese Weise nachgewiesen: HL-A 3 + 1, HL-A 7 + W27, HL-A 7 - W10, HL-A 5 + 12 + SL.

Methodische Untersuchungen der Absorption und Elution HL-A-spezifischer Antikörper mit Plättchen bestätigten im wesentlichen die Brauchbarkeit des von Shulman et al. (35) beschriebenen Verfahrens. Änderungen dieser Methode werden vorgeschlagen. Auf die Möglichkeit der Gewinnung geeigneter komplementfixierender Typisierungsreagenzien durch Anreicherung der Antikörperspezifität in den Eluaten wird hingewiesen.

Mit 163 derartigen Eluaten aus 26 Schwangerenserum und 19 Seren polytransfundierter Patienten wurden 7 HL-A-Antigene des 1. Locus und 13 Antigene des 2. Locus mit Hilfe der Plättchen-MKBR bei 423 unverwandten Blutspendern typisiert. Der Vergleich der Typisierungsergebnisse mit den parallel durchgeführten Typisierungen der gleichen Spender in der MLTox zeigte bei 14 der in beiden Methoden bestimmten Antigene eine Übereinstimmung der Ergebnisse größer als 98 %. Aufgrund der Typisierungsergebnisse wurden die Genfrequenzen der typisierten Antigene in der deutschen Bevölke-

rung ermittelt. Die nach den Typisierungsergebnissen erfolgte Auswertung der Typisierungseluate ergab bei 153 der verwendeten Eluate hochsignifikante Reaktionsergebnisse.

Der Einfluß von Neuraminidase und 10 verschiedenen Proteasen auf HL-A-Antigene der Plättchen, nach 15 min. Inkubation wurde bei 6 vollständig typisierten Spendern untersucht. Mit Ausnahme der Trypsin-, Chymotrypsin- und Pilzproteinasebehandlung wurde bei keinem der anderen Enzyme eine deutliche Abschwächung der HL-A-Antigene gefunden. In keinem Fall wurden HL-A-Antigene nach der enzymatischen Behandlung besser darstellbar.

F. LITERATUR

1. Ackroyd, J.F.: The pathogenesis of thrombocytopenic purpura due to hypersensitivity to sedormis. Clin. Sci. 7:249 (1949)
2. Ackroyd, J.F.: The role of complement in sedormid purpura. Clin. Sci. 10: 185 (1951)
3. Aster, R.H., Cooper, H.E. and Singer, D.L.: Simplified complement fixation test for the detection of platelet antibodies in human serum. J. Lab. clin. Med. 63: 161 (1964)
4. Ceppellini, R., Curtoni, E.S., Mattiuz, P.L., Miggiano, V., Scudeller, G. and Serra, A.: Genetics of leucocyte antigens. A family study of segregation and linkage. In: Histocompatibility Testing 1967, pp. 149-185 (Munksgaard, Copenhagen 1967)
5. Colombani, J., Colombani M., Benajam, A. and Dausset, J.: Leucocyte and platelet antigens defined by platelet complement fixation test (antigen 1, 5, 6, 11 and 14). In: Histocompatibility Testing 1967, p. 413 (Munksgaard, Copenhagen 1967)
6. Colombani, M., Colombani J., Dehay, C. and Dausset, J.: A microtechnique of platelet complement fixation. Results obtained with sera and eluates as the source of antibody. In: Histocompatibility Testing 1970, p. 553 (Munksgaard, Copenhagen 1970)
7. Colombani, J., D'Amato, J., Gabb, B., Smith, G. and Svegaard, A.: International agreement on a microtechnique of platelet complement fixation (Pl. C. Fix.). Transplantation Proceedings 3: 121 (1971)
8. D'Amato, J.: The micro-complement-fixation test. I. A solution of the technical problems of HL-A-typing. Vox. Sang. 18: 334 (1970)
9. D'Amato, J., Leeuwen, van A., Svegaard, A. and Rood van, J.J.: The micro-complement-fixation test. II. Serologic and comparative studies. In: Histocompatibility Testing 1970, p. 539 (Munksgaard, Copenhagen 1970)
10. Dausset, J.: Iso-leuco-anticorps. Acta haemat. (Basel) 20: 156 (1958)
11. Dausset, J., Colin, M. and Colombani, J.: Immune platelet isoantibodies. Vox. Sang. (Basel) 5: 4 (1960)
12. Dausset, J. & Tangün, Y.: Les iso-anticorps anti-plaquetaires décelés par fixation du complément. Transfusion (Paris) 7: 333 (1964)

13. Dausset, J., Colombani, J., Colombani, M., Legrand, L. & Feingold, N.:
Un nouvel antigène du système HL-A (HU-1): l'antigène 15, allèle possible des antigènes 1, 11, 12.
Nouv. Rev. franc. Hémat. 8: 398 (1968)
14. Dausset, J.: Persönliche Mitteilung über Genfrequenzen - Nov. 1971
15. Davies, D. A. L., Manstone, A. J., Viza, D. C., Colombani, J. and Dausset, J.:
Human transplantation antigens: The HL-A (Hu- 1) system and its homology with the mouse H-2 system.
Transplantation 6: 571 (1968)
16. Engelfriet, C. P.: Cytotoxic iso-antibodies against leucocytes. Thesis, Amsterdam
17. Eurotransplant: Mitteilung über Genfrequenzen - Sept. 1970
18. Gabb, B. W., & Bodmer, W. F.:
A micro-complement-fixation test for platelet antibodies.
In: Histocompatibility Testing 1970, p. 543 (Munksgaard, Copenhagen 1970)
19. Heinrich, D. und Mueller-Eckhardt, Ch.:
HL-A-spezifische, C'-fixierende antithrombozytäre Antikörper. II. Absorptions- und Elutionsuntersuchungen an Schwangerenseren mit HL-A-spezifischen Antikörpern.
Blut 23: 267 (1971)
20. Heinrich, D. and Mueller-Eckhardt, Ch.:
Micro complement fixation with platelets. A methodological Analysis. Vox. Sang. 27: 251 (1971)
21. Heinrich, D. und Mueller-Eckhardt, Ch.:
Möglichkeiten und Erfahrungen bei der Gewinnung von spezifischen Antikörpern des HL-A-Systems für die Mikro-Komplementbindungsreaktion mit Thrombozyten.
Vortrag auf dem Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Bluttransfusion; Giessen, 12-15 April, 1972
22. Kissmeyer-Nielsen, F. & Thorsby, E.:
Human Transplantation Antigens. Transplantation Reviews 4 (Munksgaard, Copenhagen 1970)
23. Mann, D. L., Rogentine, G. N., Fahey, J. L. and Nathenson, S.:
Human lymphocyte membrane (HL-A) alloantigens: Isolation, purification and properties.
J. Immunol. 103: 282 (1969)
24. Mattiuz, P. L., Ihde, D., Piazza, A., Ceppellini, R. and Bodmer, W. F.:
New approaches to the population genetic and segregation analysis of the HL-A system.
In: Histocompatibility Testing 1970, p. 193 (Munksgaard, Copenhagen 1970)

25. Mayer, M.M.:
Complement and complement-fixation
Kabat & Mayer: Experimental immunochemistry, p. 133
(Thomas, Springfield 1961)
26. Mayr, W.R.:
The leucocyte antigen Maki.
In: Histocompatibility Testing 1970, p. 171 (Munksgaard,
Copenhagen 1970)
27. Mollison, P.L.:
Blood Transfusion in Clinical Medicine. (Oxford, 1967)
28. Mueller-Eckhardt, Ch., Heinrich, D., Escolar, J. und Götze, U.:
HL-A-spezifische, C'-fixierende antithrombozytäre Antikörper.
I. Antikörper-Frequenz und Spezifität im Serum von 500 Schwangeren.
Blut 23: 207 (1971)
29. Nymand, G., Heron, I. and Jensen, K.G.:
Micro complement fixation test for typing of platelets. A new
method. Vox. Sang. 20: 85 (1971)
30. Rubin, H.: Antibody elution from red blood cells.
J. clin. Path. 16: 70 (1963)
31. Shulman, N.R., Aster, R.H., Leitner, A. and Hiller, M.C.:
A new syndrome of post-transfusion immunologic purpura.
J. clin. Invest. 39: 1028 (1960)
32. Shulman, N.R., Aster, R.H., Leitner, A. and Hiller, M.C.:
Immunoreactions involving platelets. V. Post-transfusion purpura
due to a complement-fixing antibody against a genetically controlled
platelet antigen. A proposed mechanism for thrombocytopenia and its
relevance in "autoimmunity".
J. clin. Invest. 40: 1597 (1961)
33. Shulman, N.R., Marder, V.J., Aledort, L.M. and Hiller, M.C.:
Complement-fixing iso-antibodies against antigens common to
platelets and leucocytes.
Trans. Ass. amer. Physcns 75: 89 (1962)
34. Shulman, N.R., Aster, R.H., Pearson, H.A. and Hiller, M.C.:
Immunoreactions involving platelets. VI. Reactions of maternal
isoantibodies responsible for neonatal purpura. Differentiation
of a second platelet antigen system.
J. clin. Invest. 41: 1059 (1962)
35. Shulman, N.R., Marder, V.J., Hiller, M.C. and Collier, E.M.:
Platelet and leucocyte isoantigens and their antibodies:
Serologic, physiologic and clinical studies.
Progress in Hematology, Vol. 4, p. 222 (1964)
(Grune and Stratton, New York 1964)
36. Shulman, N.R.: Immunologic considerations attending platelet
transfusions. Transfusion (Philad.) 6: 39 (1966)

37. Smith, G.S. & Walford, R.L.:
A micro-complement-fixation method for determining isoantigens of human platelets.
In: Histocompatibility Testing 1970, p. 549 (Munksgaard, Copenhagen 1970)
38. Svejgaard, A. & Kissmeyer-Nielsen, F.:
Cross-reactive human HL-A isoantibodies.
Nature (London) 219: 868 (1968)
39. Svejgaard, A. & Kissmeyer-Nielsen, F.:
Complement-fixing platelet iso-antibodies. I. A quantitative technique for their detection.
Vox. Sang. 14: 106 (1968)
40. Svejgaard, A.:
Iso-antigenic systems of human blood platelets. A survey.
Series Haematologica, Vol. II, 3, (1969) (Munksgaard, Copenhagen)
41. Svejgaard, A., Thorsby, E., Hauge, M. and Kissmeyer-Nielsen, F.:
Genetics of the HL-A-system. A population and family study.
Vox. Sang. 18: 97 (1970)
42. Svejgaard, A., Kissmeyer-Nielsen, F. and Thorsby, E.:
HL-A typing of platelets.
In: Histocompatibility Testing 1970, p. 153 (Munksgaard, Copenhagen)
43. Terasaki, P.I. and Mc.Clelland, J.D.:
Microdroplet assay of human serum cytotoxins.
Nature (London) 204: 998 (1964)
44. Thierfelder, S. und Pfisterer, H.:
Immunologische Aspekte der Thrombozytentransfusion.
Blut 18: 97 (1968)
45. Thorsby, E. & Kissmeyer-Nielsen, F.:
HL-A antigens and genes III. Production of HL-A typing antisera of desired specificity.
Vox. Sang. (Basel) 17: 102 (1969)
46. Thorsby, E., Bratlie, A., Mayr, W., Sparck, J., Svejgaard, A., Kjerbye, K.E. and Kissmeyer-Nielsen, F.:
The HL-A system: Antigenic heterogeneity and four new antigens.
Tissue Antigens 1: 32 (1971)
47. Walford, R.L., Gallagher, R. and Sjaardo, J.R.:
Serologic typing of human lymphocytes with immune serum obtained after homografting.
Science 144: 868 (1964)

48. Walford, R. L., Shanbrom, E., Troup, G. M., Zeller, E. and Ackerman, B.:
Lymphocyte grouping with defined antisera
In: Histocompatibility Testing 1967, p. 221 (Munksgaard, Copenhagen 1967)
49. Walford, R. L.:
The Isoantigenic Systems of Human Leucocytes, Medical and Biological Significance.
Series Haematologica, Vol. II, 2, (1969) (Munksgaard, Copenhagen)
50. Weber, E.:
Grundriss der biologischen Statistik
Gustav Fischer Verlag Jena, VI. Auflage
51. WHO: Nomenclature for factors of the HL-A system.
Bull. Wld. Hlth. Org. 39: 483 (1968)

Herrn Prof. Dr. Ch. Mueller-Eckhardt danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, für die Durchsicht und die wertvollen Hinweise zur Abfassung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Dr. med. D. Heinrich für die geduldige, tatkräftige Unterstützung und Kritik, die vielen Ratschläge und Anregungen, die das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Nicht zuletzt gilt mein Dank den Mitarbeiterinnen der Abteilung für Klinische Immunologie und Bluttransfusion, insbesondere Frau S. Beckmann und Frau U. Götze, für die freundliche Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

LEBENS LAUF

Am 3. Juni 1946 wurde ich als Sohn von Ladislaus Czitrom (1949 verstorben) und seiner Ehefrau Cecilia, geb. Siegler, in Kronstadt (Brasov), Rumänien, geboren.

Ich besuchte die Volksschule und anschließend das Gymnasium in Kronstadt, wo ich im Sommer 1964 die Reifeprüfung bestand.

Danach studierte ich Medizin in Neumarkt (Tirgu-Mures, Rumänien) und, nach meiner Übersiedlung in die BRD im Herbst 1969, in Giessen, wo ich am 26.1.1971 die ärztliche Prüfung bestand.

Meine Medizinalassistentenzeit leistete ich an den Chirurgischen und Medizinischen Universitätskliniken in Giessen ab und erhielt am 1.4.1972 meine Approbation als Arzt.

